

A *Bacillus subtilis* általános stresszválasza

2000. május

Ph. D. Értekezés

Készült: 1996 – 2000 között, a József Attila Tudományegyetem (Szegedi Tudományegyetem) Biotechnológiai Tanszékén, Szegeden

Témavezető: Dr. Kovács Kornél, Dr. Mécs Imre

Készítette: Kovács Tamás

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	3
1.1	A Gram negatív baktériumok általános stresszválasza	4
1.2	A Gram pozitív baktériumok általános stresszválasza	5
1.2.1	A <i>Bacillus subtilis</i> stresszfehérjéinek csoportosítása	6
1.2.2	A σ^B regulon	8
1.2.3	A genetikai kompetencia, degradatív enzimek szintézise és a motilitás	15
1.2.4	A kétkomponensű rendszerek	19
2	Célkitűzések	22
3	Anyagok, módszerek	23
3.1	Vegyszerek	23
3.2	Enzimek	24
3.3	Kitek	24
3.4	Tenyésztési és stresszkörülmények	24
3.4.1	A törzsek tárolása	24
3.4.2	Tenyésztési körülmények	24
3.4.3	Sejtszám-meghatározás	25
3.4.4	Stresszkörülmények	25
3.5	Felhasznált törzsek	27
3.6	Tápfolyadékok-táptalajok	28
3.6.1	Módosított Belitzky-Minimálmédium	28
3.6.2	MOPS-pufferolt minimálmédium	28
3.6.3	Na ₃ Citrát/Citromsav-pufferolt minimálmédium	28
3.6.4	Bipufferolt minimálmédium	28
3.6.5	A minimálmédiumok kiegészítése	29
3.6.6	LB (Luria-Bertani) - tápfolyadék	29
3.6.7	LB (Luria-Bertani) – táptalaj	30
3.7	A <i>sigB</i> és a <i>gsiB</i> gének transzkripció-analízise	30
3.7.1	A <i>sigB</i> -mRNS próba előállítása	30
3.7.2	A <i>gsiB</i> -mRNS próba előállítása	30
3.8	A sejtek ATP-pooljának meghatározása	38
3.8.1	Nukleotid-extrakció <i>Bacillus subtilis</i> -ből (TCA-módszer)	38
3.8.2	Luciferáz-assay	38
3.9	A sejtek ATP- és GTP-pooljának együttes meghatározása: HPLC kísérletek	39
3.10	A sejtfelszíni hidrofilitás meghatározása	40
3.11	A talaj-részecskékhez való kitapadási képesség meghatározása	41
4	Eredmények	41
4.1	A <i>Bacillus subtilis</i> σ^B aktiválásához vezető szignál-transzdukciós út	41
4.1.1	Az ATP-drop jel szerepe a σ^B -függő gének indukciójában	42
4.1.2	A GTP-drop jel szerepe a σ^B -függő gének indukciójában	43
4.1.3	Ionofor- (kivéve protonofor) kísérletek	51
4.1.4	Puromicin - kísérletek	53
4.1.5	A σ^B -regulon savstresszben játszott szerepe	55
4.1.6	A lúgstressz hatása a σ^B regulon génjeinek expressziójára	59
4.1.7	Oldószer-kontrollok	60
4.2	Módszerfejlesztés: Az ATP és GTP pool analízise stresszhatások után	62
4.3	A <i>Bacillus subtilis</i> sejtfelszíni stresszválasza	63
4.3.1	A <i>B. subtilis</i> sejtek felszíni hidrofilitásának vizsgálata stresszhatások alatt	63
4.3.2	A sejtfelszíni hidrofilitás-változások néhány lehetséges belső szignálja	68
4.3.3	A hidrofilitás-változás fiziológiai szerepe	73
5	Diszkusszió	75

5.1	<u>A σ^B regulon aktivációjához szükséges közvetlen jel</u>	75
5.2	<u>A sejtfelszíni szintű stresszválasz</u>	86
5.3	<u>Eredményeink gyakorlati alkalmazása</u>	90
6	<u>Hivatkozások</u>	91
7	<u>Rövidítések</u>	107

1 Bevezetés

Az evolúció során kialakult tendencia a sejtek egyre speciálisabb típusokká való differenciálódása, mely folyamat csúcsán a valódi szövetekkel rendelkező élőlények (*eumetazoa*) állnak. A többsejtű szervezetségi szint jelentős előnyöket rejt magában: a környezet hat a sejtre, a sejt pedig (a beérkező inger integrálása alapján) irányítottan visszahat környezetére. Ez a termodinamikailag félig nyitott rendszerek sajátja. Az egysejtű szervezetek közvetlenül érintkeznek külső környezetükkel, melynek bármilyen megváltozása közvetlen hatást gyakorol a sejtre, emiatt jóval szélesebb spektrumú paraméter-változásnak vannak kitéve. Ezzel szemben a valódi szövetekkel rendelkező élőlények sejtjei, összhangban működve, a külső környezet bizonyos paramétereinek (pl. pH, hőmérséklet, ionerősség stb.) ingadozásait nagymértékben képesek kompenzálni. Sejtjeik többsége nem is érintkezik a külső környezettel, közvetlen környezetüket a többi sejt jelenti, melyet Claude Bernard francia fiziológus javaslatára belső környezetnek ("*milieu interieur*") nevezünk (Ádám és Fehér, 1990).

A továbbiakban azt a nagyságú és irányú paraméter-változást, mely a sejt számára kellemetlen, és azt védekező reakciókra készíti, stressznek fogjuk nevezni.

Bármely paraméter szempontjából a sejt rendelkezik egy optimummal, mely biokémiai folyamatai számára a legmegfelelőbb. Bármely irányú eltérés ettől az optimumtól a sejt életképességének csökkenéséhez vezet, illetve –miután az adott paraméter nagysága átlépte a kritikus szélsőértéket- a sejt elpusztul. Az életképességet a paraméter-változás függvényében Gauss-görbével írhatjuk le. A stressz-tolerancia és az optimum mértéke a különböző speciesek között igen széles határokon belül mozoghat.

A baktériumok (és más egysejtű élőlények) tehát nem rendelkeznek belső környezettel, ezért "tompítatlanul" ki vannak téve a környezeti stresszhatásoknak. Ezen élőlények igen változatos stratégiákkal rendelkeznek a különböző stresszhatások túléléséhez. Egy adott stressz fajta (pl. hősokk) esetén a Gram negatív és Gram pozitív baktériumok stresszválaszának elemei illetve azok indukciójának szabályozása (szignáltranszdukciós út, génexpresszió szabályozása) gyakran alapvetően eltérnek egymástól. Ezért az alábbiakban külön alfejezetekben fogjuk ismertetni a Gram negatív baktériumok stresszbiológiájának

alapvető vonásait, illetve részletesebben fogunk foglalkozni a Gram pozitív baktériumok stresszválaszának jellemzőivel.

1.1 A Gram negatív baktériumok általános stresszválasza

A Gram negatív baktériumok általános stresszválaszát az *Escherichia coli* példáján ismertetjük, mivel ez a baktérium a legjobban jellemzett. A közismert chaperone-chaperonin rendszereket (DnaK-DnaJ, GroEL) illetve a baktériumok hősokk-válaszának részletes mechanizmusát nem ismertetjük, mivel nem kapcsolódik munkánkhoz.

Az *E. coli*, ha egy adott tápanyag a médiumban az optimális koncentráció alá esik, olyan válaszreakciót ad, melynek vannak az adott tápanyagra nézve specifikus elemei (pl. cAMP/CRP – C-limitációnál, NtrB/NtrC/ σ^{54} – N-limitációnál, PhoR/PhoB – P-limitációnál) (Nixon et al., 1986, von Kruger et al, 1999, Van Dien and Keasling, 1998). Ezekben az esetekben a baktérium folytatja növekedését. Amennyiben azonban a baktérium környezete teljesen kimerül az adott tápanyagban, a baktérium stacionáris fázisba lép, és ekkor a kiváltó hiányzó tápanyag minőségétől teljesen független, általános stresszválasz következik be. Ezt a fajta stresszválaszt többféle, erős stresszhatás is ki tudja váltani. Stacionáris fázisban komplex fiziológiai és morfológiai változások léphetnek fel: strukturális változások történnek a sejtfalban, megváltozik a membrán-összetétel, a DNS kompaktabbá, szuperspiralizáltabbá válik, a 70 S riboszóma-alegységekből 100 S dimerek lesznek. A tápanyag-összetételtől függően a baktériumok tartalék-tápanyagokat (polifoszfátok, glikogén) és védekező anyagokat (pl. trehalóz) szintetizálnak (Aronis, 1991). Ebben a fázisban történik a stacionáris fázis-specifikus (más néven: poszt-exponenciális) fehérjék génjeinek az indukciója, mely folyamat tehát független a kiváltó stressz minőségétől. Ezen fehérjék egy részének valószínűleg stressz elleni protektív szerepe is lehet, mivel a stacionáris fázisú baktériumok jobban elviselik az extrém hő-, H_2O_2 - és NaCl-stresszt.

Az *E. coli* általános stresszválaszának középpontjában a σ^S alternatív szigma-faktor áll, mely az *rpoS* gén terméke. A σ^S szerkezetében nagyon hasonló a σ^A -hoz: olyan motívumok, melyek a housekeeping szigma-faktorokban konzervatívak, de az alternatív szigma-faktorokban variabilisek, a housekeeping szigma-faktorokra hasonlítanak a σ^S esetében. Az *rpoS* gén hiánya esetében a sejt többféle stressz (pl. éhezés) esetében szenzitívebbé válik a vad törzsnél, és nem lesz képes glikogént szintetizálni. Többféle stresszhatás, ha az exponenciális fázisú baktériumot érik, kiváltja a σ^S függő gének indukcióját (Aronis, 1996). Ilyen stresszhatások az ozmotikus sokk, a hősokk és a sav-stressz (Aronis, 1996, Bordes, 2000). A σ^S aktivitásának szabályozásával kapcsolatban megjegyzendő, hogy elsősorban poszt-transzkripcionális szinten szabályozódik: nem-stressz körülmények között fél életideje

igen alacsony, a ClpXP proteáz degradálja (Aronis, 1996). A σ^S -t az RssB szabályozó fehérje prezentálja a proteázoknak (Aronis, 1996, Becker et al., 2000). Az RssB valószínűleg a prezentáláson túlmenően anti-sigma-faktor szerepet is betölt (Becker et al., 2000). A HF-I fehérje esszenciális a σ^S transzlációjához (Aronis, 1996). A szabályozásban pozitív szabályozóként részt vesz még a H-NS, amely egy histon-like protein (Aronis, 1996). A HF-I és a H-NS pozitív befolyásának módja még nem tisztázott.

Összefoglalásként megállapítható, hogy a σ^S regulon elemei *E. coli*-ban az általános stresszfehérjék. Vannak közöttük védekező funkciójú fehérjék (pl. OsmE, mely ozmotikus sokk ellen nyújt védelmet), valamint tartalék tápanyagok szintézisében szerepet játszó enzimek (Bordes et al., 2000).

Ezek után részletesebben ismertetjük a Gram pozitív baktériumok általános stresszválaszának jellemzőit.

1.2 A Gram pozitív baktériumok általános stresszválasza

A Gram pozitív baktériumok közül elsősorban a *Bacillus subtilis* stresszbiológiájának jellemzőit tekintjük át, mivel a csoporton belül ezeket jellemezték legalaposabban. Ehhez hozzájárul az a közelmúltban befejeződött program, melynek során meghatározták a *B. subtilis* teljes genomi szekvenciáját (Kunst et al., 1997).

A *Bacillus subtilis* obligát aerob, spórázó pálca, és az edaphon részeként a talaj felsőbb rétegeiben él.

Természetes közegében rendkívül sokfajta stresszhatásnak van kitéve. Így például a talaj hirtelen felmelegedése hősokkot, lehűlése hidegsokkot, kiszáradása ozmotikus stresszt, míg az oxigén parciális nyomásának csökkenése oxigén-limitációt okoz. Ezen kívül, a különböző hullámhosszúságú sugárzások, más élőlények által termelt anyagok biológiai hatása, valamint a tápanyagok mennyiségének csökkenése, illetve komponenseinek változása mind-mind olyan hatások, melyek válaszra készítetik a baktériumot. Egy viszonylag gyenge és rövid ideig tartó stresszre adott válasz lehet a hatás által irányított, vagy csupán kiváltott mozgás, és/vagy különböző stresszfehérjék szintézise. Ez utóbbiak egy része chaperone, mások a sejt anyagcseréjének átállítására szolgálnak, vannak köztük lebontó enzimek, membránfehérjék, és például a károsodott DNS javítására szolgáló enzimek is.

A stresszhatások eredményeképpen a baktérium stacionális fázisba léphet, mely anyagcseréjének átállítódása eredményeképpen jön létre. Ekkor a sejtosztódás szünetel, de a sejt vegetatív marad. A stacionális fázisú baktériumban a következő változások mennek

végbe: a DNS szuperspiralizáltabbá válik, megindul a hiszton-szerű fehérjék (HLP-k) szintézise, glükogén szintetizálódik, a 70 S riboszómákból 100 S dimerek lesznek, a baktérium antibiotikumot termel, és membránváltozást szenved. E fázisban történik az ún. stacionáris fázis-specifikus gének expressziója, mely folyamat –az anyagcsere átállításával együtt- a túlélést szolgálja. Ha a *B. subtilis* képtelen az adott körülmények között tovább vegetatív sejtként élni, akkor –a genetikai állomány megőrzése érdekében- bekövetkezik a sporuláció.

1.2.1 A *Bacillus subtilis* stresszfehérjéinek csoportosítása

A *B. subtilis* stresszbiológiájának egészen a közelmúltig volt egy nevezéktani sajátossága: Hsp-knek (hősokk fehérjéknek) azokat a fehérjéket nevezték, melyek kizárólagosan hősokk esetén indukálódnak (Richter and Hecker, 1986, Hecker and Völker, 1990, Völker et al., 1994, Hecker et al, 1996). Ezzel szemben az általános stresszfehérjék kategóriájába tartoztak azon fehérjék, melyek struktúrgénjei többféle stresszhatás esetén mutatnak expresszió-növekedést (Richter and Hecker, 1986, Hecker and Völker, 1990, Völker et al., 1994, Hecker et al, 1996). 1998-ban bizonyították, hogy a hsp-k (hősokk-gének) hősokkon kívül etanol- és puromicin-kezelésre is indukálódnak (Mogk et al., 1998), tehát a fenti nomenklatura érvényét veszítette.

Jelenleg –Hecker és Völker javaslata alapján (Hecker and Völker, 1998)- az alábbi felosztást fogadjuk el érvényesnek:

1.2.1.1. AZ I. OSZTÁLYÚ STRESSZFEHÉRJÉK

Az I. osztályú stresszfehérjék közé sorolják a klasszikus chaperone-okat, pl. a GroELS, DnaK, DnaJ, GrpE (Hecker and Völker, 1998, Mogk et al., 1998). Ezek génjeinek promoterét a housekeeping σ^A ismeri fel, ami lényeges különbség az *Escherichia coli*-hoz képest, ott ugyanis az alternatív szigma-faktor σ^{32} (RpoH, σ^E) szükséges a hősokk-válaszhoz (Bukau, 1993).

Bacillus subtilis-ben az I. osztályú stresszfehérjék génjeinek expresszióját a HrcA nevű globális represszor szabályozza, mely aktivitása a GroEL/GroES befolyása alatt áll (Mogk et al., 1997). A HrcA target-szekvenciája az ún. CIRCE-elem, egy 2x9 bázispár inverted repeat, 9 bázispár nukleotiddal elválasztva (Zuber and Schumann, 1994, Yuan and Wong, 1995, Schulz and Schumann, 1996).

A HrcA represszor aktív konformációjának létrejöttéhez szükség van a GroELS chaperonin-gépezet közreműködésére (Mogk et al., 1997). Hő sokk esetén, a sérült fehérjék elvonják a GroE-t, ezáltal kevesebb aktív HrcA lesz a sejtben. Miután a hibás térszerkezetű fehérjék kijavítása befejeződött, bekövetkezhet a hő sokk-válasz kikapcsolása: a GroELS-gépezet ismét segít a HrcA represszor aktív konformációját kialakítani (Mogk et al., 1998).

1.2.1.2. A II. OSZTÁLYÚ STRESSZFEHÉRJÉK

A II. osztályú stresszfehérjék csoportjába tartozó proteinek génjeinek promoterét kizárólagosan egy alternatív szigma-faktor, a σ^B képes felismerni (Hecker and Völker, 1998). Mivel jelen értekezés igen jelentős részét teszik ki a σ^B -regulonnal kapcsolatos kísérletek, ezért ezzel a csoporttal külön foglalkozunk az 1.2.2. fejezetben.

1.2.1.3. A III. OSZTÁLYÚ STRESSZFEHÉRJÉK

A III. osztályú stresszfehérjék közös jellemzője, hogy a CtsR nevű globális represszor szabályozása alatt áll génjeik indukciója (Krüger and Hecker, 1998, Mogk et al., 1998). A CtsR hélix-turn-hélix motívummal rendelkező DNS-kötő fehérje, melyet a *clpC* operon kódol (Krüger and Hecker, 1998). A ClpC ATP-áz aktivitású enzim, egy 6 génes operon 4.génje (Krüger et al., 1996), részt vesz a genetikai kompetencia kialakulásában, degradatív enzimek szintézisében, a sporuláció komplex élettani folyamatában, a sejtosztódás szabályozásában és egyes stressz-fajták elleni védekezésben (Krüger et al., 1994, Msadek et al., 1994, Krüger and Hecker, 1997, Turgay et al., 1997, Nanamiya et al., 1998,). A *clpC* operon struktúrgénjei, promoter-disztális sorrendben a következők: *ctsR* (*yacG*)(Krüger et al. 1997, Kunst et al, 1997); egy Zn-finger fehérje (Krüger et al., 1997); egy arginin-kináz (Krüger et al., 1997); *sms* (Antelmann et al., 1996); *comY* (Antelmann et al., 1996). Az *sms* és a *comY* gének termékei a DNS-repairben és a genetikai kompetencia kialakításában töltenek be funkciót.

Valószínűleg létezik egy CtsR-regulon, mely a protein-refoldingban, a fehérje-javításban és a proteolízisben játszik szerepet (Krüger and Hecker, 1998). Ebbe a regulonba tartozhat a *clpC* (Krüger and Hecker, 1998), a *clpX* (Krüger and Hecker, 1998) és a *clpP* (Derré and Msadek, 1997). A *clpP* esetében meghatározták a CtsR target-szekvenciáját is (Derré and Msadek, 1997). Feltételezik, hogy a CtsR-t inaktiválják a fehérje-denaturáló hatású stressz-fajták (Krüger and Hecker, 1998). Ekkor a CtsR-regulon aktív. Ilyen stresszek például a hő sokk, az etanol- és a puromicin-kezelés, az oxidatív stressz, stb. Ugyanakkor Krüger és Hecker hipotézise szerint az energia-limitáció és a sóstressz nem inaktiválja a represszort

(Krüger and Hecker, 1998). Erre az elméletre a diszkusszió részben külön ki fogunk térni, mivel ellentétes néhány eddigi eredménnyel. Megjegyzendő, hogy a humán patogén *Listeria monocytogenes*-ben is bizonyították a CtsR-regulon létét (Nair et al., 2000). A *Listeria monocytogenes ctsR* génjéről *B. subtilis*-ben funkcionáló CtsR-t tudtak szintetizáltatni, tehát a két fehérje nagymértékben homológ (Nair et al., 2000).

1.2.1.4. A IV. OSZTÁLYÚ STRESSZFEHÉRJÉK

Ez az -újabb létrehozott- osztály azon stresszfehérjéket tömöríti, melyek az előző három osztályba nem sorolhatóak (Mogk et al., 1998). Ide tartoznak például a thioredoxint kódoló *trxA* (Scharf et al., 1998) és a *lon* (Riethdorf et al., 1994).

1.2.2 A σ^B regulon

A *Bacillus subtilis*-ben eddig 17 különböző szerkezetű σ faktort írtak le. A korábban megismert 10 közül 9 eltérő promoter-specifitású (Haldenwang, 1995): a σ^A a housekeeping szigma-faktor, a σ^E , σ^F , σ^G és σ^K a sporulációban résztvevő gének expressziójáért felelős, a σ^H a korai sporulációs gének illetve egyes, a genetikai kompetenciában szerepet játszó gének promotereit ismeri fel. A degradatív enzimek szintézisének és a kemotaxis- és flagelláris gének expressziójának a szabályozását a σ^D és a σ^L látja el (ezek azonos promoter-specifitásúak). A σ^C funkciója ismeretlen. A *B. subtilis* genomjának szekvenálása során további 7 szigma-faktort írtak le, melyek valószínűleg extracitoplazmatikus funkciójúak (Kunst et al., 1997). Közülük a σ^X szerepet játszhat a *B. subtilis* stresszbiológiájában, ugyanis hiánya megnövekedett hősokk -szenzitivitást okoz (Huang et al., 1997), illetve részlegesen átfed a σ^B regulonnal (Huang et al., 1997): egy autolizin-szabályozó fehérje génje, a *lytR* illetve a membránkötött glükózil-transzferázt kódoló *csbB* gének a σ^B és a σ^X kettős szabályozása alatt állnak (Lazarevic et al., 1992, Akbar and Price, 1996, Huang et al., 1997). Az a tény, hogy a σ^X és a σ^W regulonnak is vannak közös elemei (Huang et al., 1998) nem zárja ki ez utóbbi szigma-faktor szerepét sem a *B. subtilis* stressz-élettanában.

A *B. subtilis* legrégebben leírt alternatív szigma-faktora a σ^B volt (Haldenwang and Losick, 1980).

1.2.2.1. A σ^B sejten belüli szerepe

Jelen munka kezdetekor ismert volt, hogy a σ^B -regulon génjei az alábbi stresszhatások esetén indukálódnak: hő sokk, sóstressz, oxigén-limitáció, glükóz-limitáció, oxidatív stressz (Völker et al., 1994), szétkapcsolószér (karbonil cianid m-klórphenilhidrazon: CCCP) hatása, az F_1F_0 ATP-áz gátlószerének (N,N'-diciklohexilkarbodiimid (DCCD)) hatása (Alper et al., 1994). Ezen indukciós hatások alapján valószínűsíthető volt, hogy a σ^B regulon olyan stresszfehérjéket foglal magába, melyek a különböző stresszhatások elleni toleranciában játszhatnak szerepet.

Annak ellenére, hogy a fenti stresszhatások alatt a σ^B regulon indukálódott, hiánya semmilyen változást nem okozott a vegetatív sejtek növekedésében, stressztoleranciájában és sporulációjában (Binnie et al., 1986, Duncan et al., 1987, Hecker et al., 1989, Boylan et al., 1993). 1988-as közlés szerint (Truitt et al., 1988) a σ^B -függő *ctc* gén hiánya esetén a *B. subtilis* sporulációja gátolt 48 °C-on. 1996-ban publikálták, hogy a σ^B regulon védelmet nyújt kumain-hidroperoxid ellen (Antelmann et al., 1996). Tekintettel azonban a σ^B regulon génjeinek nagy számára (jelenleg kb. 100 gén ismert) (Varón et al., 1993, Alper et al., 1994, Völker et al., 1994, Maul et al., 1995, Hecker and Völker, 1998), valószínűsíthető, hogy a regulonnak egyéb, globális funkciója is van.

Jelenleg kb. 30 σ^B -függő fehérje N-terminális szekvenciája áll rendelkezésre. Ennek alapján az alábbi hat csoportba sorolhatók a σ^B -függő stresszfehérjék, funkciójuk szerint (Hecker and Völker, 1998, módosítva jelen dolgozatban):

□ Stressz-indukálható, ATP-áz aktivitással rendelkező proteázok

Ezen enzimek feladata a sejt számára toxikus, (stressz-hatásra képződő) hibás konformációjú fehérjék lebontása (Gerth et al., 1998). A *clpC*, *clpP*, és *clpX* mutánsok extrém érzékenyek só-, hő- és etanol-stresszre és gátolt növekedést mutatnak minimál-táptalajon (Krüger et al., 1994, Msadek et al., 1994, Gerth et al., 1998). Megjegyzendő, hogy e gének hiánya kifejezettebb fenotipikus hatást eredményez, mint a σ^B hiánya, mivel e stresszfehérjék III. osztályúak, és indukciójuk első sorban a CtsR-útnak köszönhető.

□ Az oxidatív stressz elleni védekezésben szerepet játszó fehérjék

Az oxidatív stressz elleni védekezésben szerepet játszik a σ^B -függő *katE* (kataláz, H_2O_2 -degradáló enzim) és a *dps*, mely DNS-védő fehérjét kódol (Engelmann et al., 1995,

Antelmann et al., 1997a). A ClpC és a tioredoxin segíti a sérült térszerkezetű fehérjék javítását, míg a ClpP, valószínűleg a ClpX-el (esetleg a ClpC-vel) együttműködve elvégzi az irreverzibilisen károsodott fehérjék lebontását (Krüger et al., 1996, Gerth et al., 1998, Scharf et al., 1998). Az Sms és YacK fehérjék a sérült DNS kijavításában játszanak szerepet (Krüger et al., 1997). Néhány enzim szerepet játszhat a NAD szintézisében vagy NAP(P)H-függő redox reakciót katalizálhat, mely folyamatoknak szerepük lehet az oxidatív stressz elleni védekezésben (Antelmann et al., 1997b, Scharf et al., 1998, Petersohn et al., 1999).

□ Só- és víz stressz elleni védelem

A σ^B -függő gének egy része az ozmotikus stressz elleni védekezésben szerepet játszó fehérjéket kódol. Az *opuE* egy prolin-felvevő rendszer struktúrgénje, mely abszolút szükséges a külső prolin ozmoprotektánsként való felhasználásában. A *B. subtilis* két *opuE* génje közül az egyik σ^B -függő (von Blohn et al., 1997). Megjegyzendő, hogy a σ^B hiányában is képes a baktérium a prolint felvenni, és ozmotikus ellenálló képessége ebben az esetben sem csökken (von Blohn et al., 1997). A fentiekén kívül a σ^B -függő YtxH (Varón et al., 1996) és GsiB (Mueller et al., 1992, Völker et al., 1994, Maul et al., 1995) a növényi deszikkációs fehérjékkel nagy fokú homológiát mutatnak, mely alapján nem zárható ki az ozmotikus stressz elleni védekezésben betöltött szerepük. Újabb eredmények szerint (Petersohn et al., 1999) a σ^B -függő YhdN fehérje 39 %-os homológiát mutat az YccK, míg 37 %-os homológiát mutat az YxbF *B. subtilis* K^+ -csatorna fehérjékkel. Mint ismeretes, a K^+ felvétel egyike az első reakcióknak a sejt részéről, ha hirtelen magas ozmolaritású közegbe kerül (Csonka and Epstein, 1996).

□ Sejtfelszíni funkciók

A σ^B -függő *gtdB* gén az UDP-glükóz pirofoszforilázt kódolja, mely enzimnek a teicho-savak glükozilálásában van meghatározó szerepe (Varón et al., 1993). A σ^B -függő GspA a flagellint kódoló *hag* gén expressziójának szabályozásában vesz részt (Antelmann et al., 1995).

□ Multidrug-rezisztencia

A σ^B -függő *bmrUR* operon génjei részt vehetnek a baktérium számára toxikus anyagok távoltartásában (Petersohn et al., 1999). Mint ismeretes (Ahmed et al., 1994) a Bmr fehérje

különböző toxikus anyagok (pl. etidium bromid, rodamin 6G, fluorokinolin-antibiotikumok) effluxát okozza. A BmrR köti a fenti anyagokat és a *bmr* pozitív transzkripcionális szabályozójaként (aktivátor) hat (Ahmed et al., 1994).

□ Ismeretlen funkciójú fehérjék

Ebbe a csoportba azon σ^B -gének által kódolt fehérjék tartoznak, melyek nem mutatnak szignifikáns homológiát egyetlen eddig ismert fehérjével sem (Hecker and Völker, 1998, Petersohn et al., 1999), vagy nagyfokú homológiát mutatnak ugyan valamely más baktérium hasonló fehérjéjéhez, de ennek ellenére szerepük ismeretlen (pl. a σ^B függő *ykzA* az *Escherichia coli* *osmC* génjével nagyfokú homológiát mutat ugyan, de szerepe ismeretlen; Völker et al., 1998).

1.2.2.2. A σ^B regulon indukciójának szabályozása

A σ^B függő promoterekről induló transzkripciók események gyakorisága alapvetően két tényezőtől függ: az aktív σ^B fehérjék számától és az adott promoter erősségétől.

Korai molekuláris genetikai tanulmányok hívták fel a figyelmet arra, hogy mutációs hatások mind csökkenthetik, mind növelhetik a σ^B regulon indukálhatóságát (Igo et al., 1987), azonban a szabályozó mechanizmus egészen az 1990-es évek közepéig ismeretlen volt.

A σ^B fehérje aktivitása elsősorban poszt-transzkripcionálisan szabályozódik, azonban a transzkripció szint is szerepet játszik a szabályozásban. A σ^B struktúrgénje a *sigB*, egy nyolc génes operon tagja, mely a *B. subtilis* kromoszómájának 40. percénél helyezkedik el (Völker et al., 1995, Wise and Price, 1995). A σ^A -függő promoter szabályozása alatt álló upstream klaszter a következő négy gént tartalmazza promoter-disztális sorrendben: *rsbR*-*rsbS*-*rsbT*-*rsbU* (Völker et al., 1995, Wise and Price, 1995). A fehérjék molekulásúlya a következő: RsbR-31 kDa, RsbS-13,3 kDa, RsbT-14,3 kDa, RsbU-38,6 kDa (Wise and Price, 1995). Ezen fehérjék szerepéről jelen pontban, később lesz szó. Az upstream és downstream klaszter között nem található transzkripciók terminátor-szekvencia. A σ^B -függő promoterrel rendelkező downstream cluster a következő négy gént tartalmazza downstream-sorrendben: *rsbV*, *rsbW*, *sigB*, *rsbX*, ettől downstream a faktor-független terminátor található (Benson and Haldenwang, 1992, Boylan et al., 1992, Benson and Haldenwang, 1993a, Dufour and Haldenwang, 1994). Az operon *sigB*-n kívüli többi 7 génje a σ^B aktivitását szabályozó fehérjét (*rsb* = Regulator of SigmaB) kódol. A szabályozást az 1. ábra mutatja

be. A σ^B aktivitásának szabályozása az alábbiak szerint történik: Az elsődleges szabályozó az anti-sigma-faktor RsbW, protein kináz. Molekulasúlya 18 kDa (Dufour and Haldenwang, 1994). Ez a fehérje nem-indukciós körülmények között köti a σ^B -t, mely így képtelen lesz az RNS polimeráz core-enzimhez kötődni, és a σ^B függő promoterek csendesek (Benson and Haldenwang, 1992, Boylan et al., 1992, Benson and Haldenwang, 1993a, Dufour and Haldenwang, 1994). Ez a kapcsolatot az RsbV nevű 12 kDa-os pozitív regulátor gátolja, mely "elvonja" a σ^B -től az RsbW-t, így felszabadítja a σ^B -t a gátlás alól (Dufour and Haldenwang, 1994). Az RsbV szubsztrátja az RsbW-nek: a foszforilált RsbV affinitása csökken az RsbW-hez, így az anti-sigma-faktor az RsbV-ről leválva képes lesz a σ^B -hez kötődni és a σ^B -függő transzkripciót gátolni (Dufour and Haldenwang, 1994). Az RsbU, mely egy PP2C foszfatáz, pozitív szabályozó szerepe azon alapul, hogy a foszforilált RsbV-t defoszforilálja és ezáltal növeli affinitását az RsbW-hez (Völker et al., 1995, Wise and Price, 1995). Feltételezik, hogy az RsbU (a későbbiekben leírandó) upstream modul induktív hatását közvetíti az RsbV-RsbW együttes (a továbbiakban: downstream modul) felé, amely képes az energiestressz (tehát minden ATP-koncentráció csökkenéssel járó stressz fajta esetén az ATP-drop) közvetlen érzékelésére Voelker et al., 1995). ATP-drop esetén bekövetkezik a σ^B -nek az RsbW-ről való leválása (Alper et al., 1994, Dufour and Haldenwang, 1994). Feltételezik, hogy azon környezeti hatások, melyek nem járnak ATP-droppal, az ún. upstream modul (RsbX-RsbS-RsbR-RsbT) révén vezetnek a σ^B aktiválásához (Voelker et al., 1995, Kang et al., 1996, Yang, 1996, Kang et al., 1998). Az RsbT egy RsbU aktivátor fehérje, mely ily módon a downstream modul aktiválása révén a σ^B aktiválásához vezet (Kang et al., 1996). Az RsbT-t nem-induktív körülmények között a defoszforilált RsbS köti, mely állapotában az RsbT nem képes az RsbU-t aktiválni (Kang et al., 1996). Az RsbT protein kináz aktivitással rendelkezik, és képes az RsbS-t foszforilálni, mely ebben az esetben leválik az RsbT-ről, amely betöltheti az RsbU-aktivátor szerepét (Kang et al., 1998). Megjegyzendő, hogy az RsbT kináz aktivitása nem szükséges az RsbU-aktivátor szerep betöltéséhez (Kang et al., 1998). Az RsbX egy 22 kDa-os PP2C foszfatáz, mely szubsztrátja a foszforilált RsbS, amely (eltávolítván a foszfát csoportot) képes lesz kötni az RsbT-t (Akbar et al., 1997). Az RsbR pozitív szabályozó fehérje, mely az RsbT-nek az RsbS-re gyakorolt kináz hatását potenciózza (Akbar et al., 1997). Nem zárható ki, hogy az RsbR gátolja az RsbX foszfatáz aktivitását (Gaidenko et al., 1999). Az RsbT képes foszforilálni az RsbR 2 threoninját, mely foszforilálást követően az RsbR elveszti az RsbT stimuláló hatását (Gaidenko et al., 1999). Megjegyzendő, hogy az RsbX foszfatáz aktivitása nem szükséges a környezeti stresszválaszhoz, viszont az RsbT kináz aktivitása esszenciális (Yang et al., 1996). Újabban egy további fehérjéről is kiderült, hogy a σ^B regulonra gyakorolt szabályozó szerepe lehet: ez az *yvfP* (újabban *rsbP*) gén által kódolt RsbP fehérje (Kunst et al. 1997, Vijay et al. 2000).



Az RsbP egy PP2C foszfatáz, mely specifikusan képes a foszforilált RsbV-t defoszforilálni, tehát pozitív szabályozó szerepe van (Vijay et al., 2000). Feltételezik, hogy a foszfatáz doménhez kapcsolódik egy PAS-domén, mely közvetlenül érzékeli az energiasstresszt és közvetíti azt a foszfatáz doménhez (Vijay et al., 2000). Ezt a hipotézist támasztja alá, hogy a PAS domének széles körben megtalálhatóak olyan intracelluláris fehérjékben, melyek érzékelik a redox-potenciálban, az oxigén-tenzióban és a sejtek általános energia-szintjében bekövetkező változásokat (Taylor and Zhulin, 1999). Baktériumokban például ilyenek az *Escherichia coli* Aer-je, mely redox-érzékelőként aerotaxist vált ki, vagy az *Azotobacter vinelandii* NifL-je, mely nitrogén-kötést szabályozó fehérje (Bibikov et al., 1997, Hill et al., 1996, Söderback et al., 1998). Mindkét említett fehérje flavoprotein, hasonlóan a *Bacillus subtilis* RsbP-jéhez (Kunst, 1997).

A fenti modell alapján az upstream modul a környezeti stresszhatások (pl. hősök, etanol stressz) érzékelését végzi, míg a downstream modulban az energiasstresszt az RsbP (a PAS-domén révén) illetve az RsbW (a kináz aktivitást szabályzó ATP koncentráció közvetlen érzékelése révén) érzékeli (Boylan et al., 1991, Boylan et al., 1993, Benson and Haldenwang, 1993b, Alper et al., 1994, Völker et al., 1994, Voelker et al., 1995, Vijay et al., 2000).

A két modul felépítését és működését az 1. ábra szemlélteti.

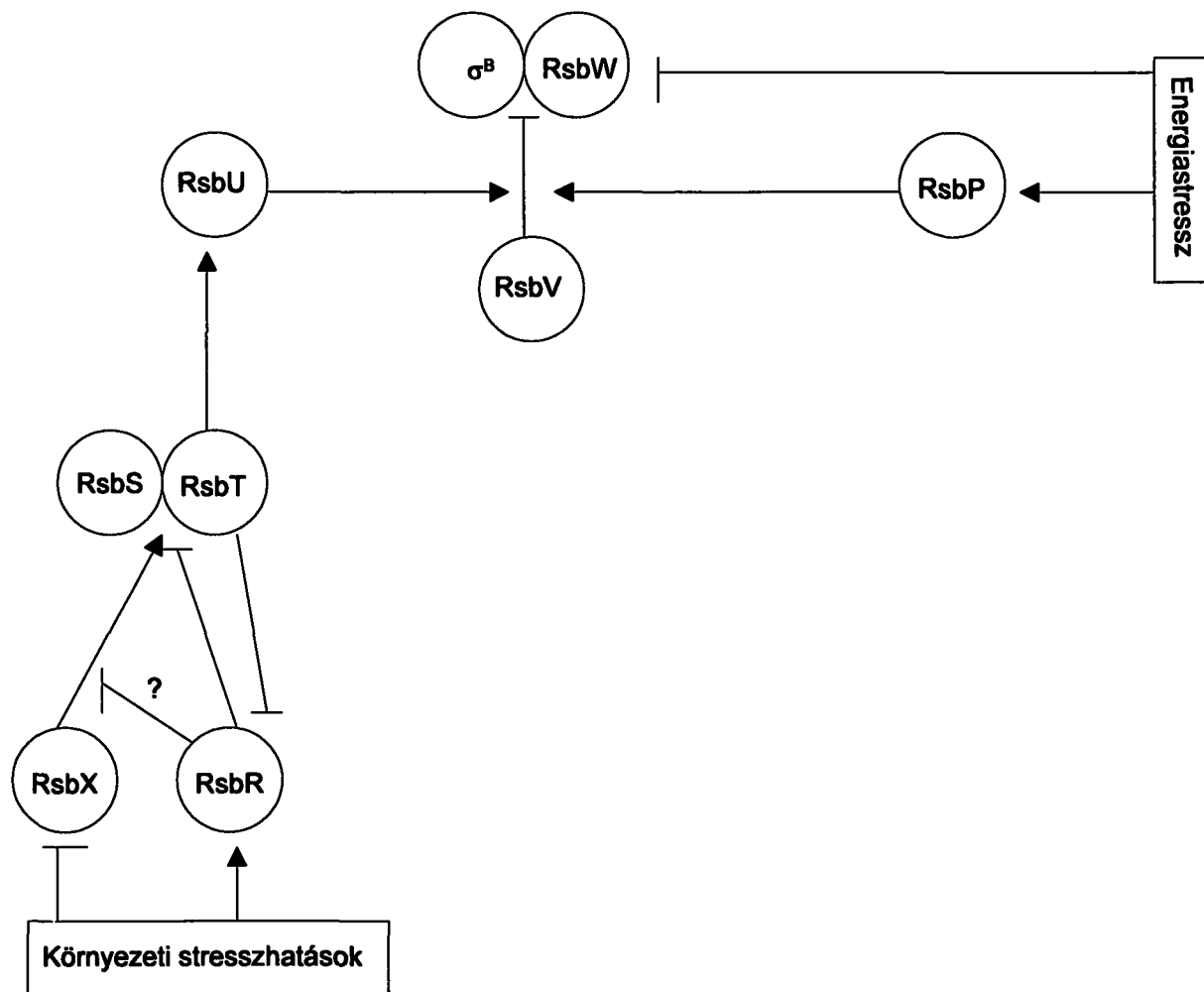
Az ábrán a nyilak pozitív (aktiválás) a tompa végű vonalak pedig negatív (gátlás) befolyásolást jelölnek.

A rendszer működése környezeti stresszhatások esetén az alábbiakban foglalható össze: Az RsbR (mely valószínűleg a stressz-szignál érzékeléséért felelős) elősegíti az RsbT-nek az RsbS-re gyakorolt kináz aktivitását. A foszforilált RsbS leválik az RsbT-ről, mely így aktiválja az RsbU-t. Az RsbU defoszforilálja az RsbV-t, mely így köti az RsbW-t, mely kötés eredményeképpen bekövetkezhet a σ^B RsbW-ről való leválása. A stresszválasz kikapcsolása esetén az RsbT foszforilálja az RsbR-t illetve az RsbX (mely valószínűleg szintén "jel-érzékelő" molekula) eltávolítja az RsbS threoninjáról a foszfátot. A defoszforilált RsbS leköti az RsbT-t, mely így nem aktiválja az RsbU-t. Ezalatt az RsbW foszforilálja az RsbV-t (melyet tehát az RsbU nem fog defoszforilálni), ezáltal az RsbW leválik az RsbV-ről és kötni fogja a σ^B -t, mely így képtelen lesz az RNS polimeráz core-enzimhez kapcsolódni. Energiastressz esetében csupán a downstream modul működik: az RsbP (mely a PAS doménje révén érzékeli az energiasstresszt) defoszforilálja az RsbV-t, mely leköti az RsbW-t. Továbbá alacsonyabb ATP-pool esetében az RsbW kináz aktivitása csökken, tehát az RsbV affinitása nagyobb lesz az RsbW-hez, mint nem-induktív körülmények esetén. A stresszválasz kikapcsolása esetén az RsbW foszforilálja az RsbV-t, és leválik arról, illetve kötni fogja a σ^B -t. Ebben az esetben valószínűleg az RsbP PAS-doménje felelős a jel érzékeléséért, és a

foszfataz domén nem-induktív körülmények között nem fogja defoszforilálni a foszforilált RsbV-t. Az RsbW kináz aktivitása a megemelkedett ATP-pool hatására nő, és foszforilálni fogja az RsbV-t.

1. ábra

A szigmaB aktivitását poszt-transzkripcionálisan szabályozó rendszer sematikus felépítése



Fontos kérdés, hogy milyen sejten belüli jel-átalakítási mechanizmus révén indukálják a környezeti stresszhatások a σ^B regulont. Egy, a σ^B aktivitását szabályozó downstream modulhoz hasonló szabályozási mechanizmus található a sporuláció folyamatában szerepet játszó σ^F esetében is: a SpoIIAB protein kináz, anti-sigma-faktor, mely köti a σ^F -et (Alper et al., 1994). A SpoIIAA egy anti-anti sigma-faktor, mely szubsztrátja lehet a SpoIIAB-nek, és az RsbV analógjaként működik (Alper et al., 1994). Ebből az analógiából és a σ^F regulonnak szétkapcsolószer (CCCP) hatására történő indukciójából kiindulva feltételezték, hogy a σ^B regulon indukciójának az ATP-drop a közvetlen szignálja (Alper et al., 1994). Később bizonyítást nyert, hogy az intracelluláris ATP-koncentráció csökkenése és a σ^B indukciójának

mértéke között nem áll fenn lineáris összefüggés (Maul et al., 1995). A közvetlen indukciós szignál mibenléte azonban nyitott kérdés maradt.

A másik tényező, mely meghatározza a σ^B függő promoterekről induló transzkripció események gyakoriságát az adott promoter erőssége. Egymással való összehasonlíthatóság céljából az alábbiakban megadjuk néhány σ^B függő promoter –35 és –10 régiójának szekvenciáját:

Gén	-35	-10
<i>sigB</i>	*GTT*TA*A	GGGT*AT
<i>ctc</i>	*GTT*TA*A	GGGT*AT
<i>gtab</i>	*GTG*TA*A	GGGT*AA
<i>csbA</i>	*GAT*TG*A	GGGT*AT
<i>gsiB</i>	*GTT*TA*A	GGGA*AT

A fenti promoterek közül a *gsiB* gén promotere a legerősebb. A –35 szekvenciákban a mind az öt génben azonos nukleotidokat "*" -al jelöltük. A –10 szekvenciákban A *-al jelölt adenin-nukleotidon kívül a "GGG" szekvencia az azonos. (Források: *sigB*- Kalman et al., 1990; *ctc*- Moran et al., 1981, *gtab*- Varón et al., 1993, *csbA*- Boylan et al., 1991, *gsiB*- Maul et al., 1995).

1.2.3 A genetikai kompetencia, degradatív enzimek szintézise és a motilitás

A genetikai kompetenciát, az extracelluláris degradatív enzimek szintézisét és a motilitást szabályozásuk szoros összefüggése miatt célszerű egy fejezetben tárgyalni. A szabályozást vázlatosan a 2. ábra szemlélteti.

A limitáló körülmények közé került baktériumok egy szub-populációja (kb. 10 %-uk) genetikailag kompetens sejtté differenciálódik (Dubnau, 1991). A genetikailag kompetens sejtek képesek DNS-t felvenni környezetükből. A genetikai kompetencia kialakulása igen komplex folyamat. A sejtek környezetükbe magas sejt-denzitás esetén szekretálják a ComX (10 aminosavból álló oligopeptid) és a CSF (5 aminosavból álló oligopeptid) molekulákat, melyek a ComP/ComA kétkomponensű rendszer aktiválásához vezetnek (Weinrauch et al., 1990, Maghunson et al., 1994, Solomon et al., 1995). A CSF (kompetencia és sporulációs faktor) koncentráció-függő módon dönt a sporuláció és a ComA-függő gének aktiválása között (Lazazzera, 1999): alacsonyabb koncentrációnál stimulálja a ComA-függő

expressziót, míg magasabb koncentrációnál gátolja ugyanazon géneket és elősegíti a sporulációt. A CSF egyébként a RapC-t gátolja, mely a ComA~P specifikus foszfatáza (Lazazzera and Grossman, 1998). A CSF a *phrC* gén terméke (Lazazzera and Grossman, 1998), a Phr-fehérjéről (köztük a CSF-ről) pedig ismert, hogy az Opp oligopeptid permeáz szükséges a felvételükhöz, mely permeáz az ABC (ATP-kötő kazettával rendelkező) transzporterek családjába tartozik (Perego, 1998).

A ComA DNS-kötő fehérje, mely foszforilált formájában képes a DNS-hez kötni, a ComP pedig egy hisztidin protein kináz, amely képes a ComA-t foszforilálni (Weinrauch et al., 1990). A ComP membrán-asszociált, két nagy transz-membrán N-terminális hurokkal rendelkezik, melyeknek szerepe van a ComX közvetítette jel érzékelésében (Piazza, 1999). A foszforilált ComA aktiválja az *srf* operont, melynek tagja a *comS* is, mely a kompetencia szabályozásában résztvevő fehérjét kódol (Nakano and Zuber, 1993, Roggiani et al., 1993, D'Souza et al., 1994, Hamoen et al., 1995). (Ugyancsak az *srf* operon tagja a surfactint kódoló struktúrgén is (Nakano and Zuber, 1989)). Megjegyzendő, hogy újabb eredmények arra utalnak, hogy az YlbF fehérje is részt vesz a ComS aktiválásában, bár ennek mechanizmusa még ismeretlen (Tortosa et al., 2000). A ComS hatása a ComK-n keresztül érvényesül, mely molekula azon döntés középpontjában áll, hogy egy sejt genetikailag kompetenssé válik-e (van Sideren et al., 1995). Exponenciális növekedés alatt a ComK-t a MecA és a ClpC (MecB) tartja inaktívan (Kong and Dubnau, 1994, Msadek et al., 1994, Turgay et al., 1997). A MecA felkínálja a ClpC/ClpP proteáz-rendszer számára a ComK-t (Krüger et al., 1994). A ComS destabilizálja a ComK-MecA-ClpC terner-komplexet (Turgay et al., 1997). A ComS a MecA-hoz köt (Ogura et al., 1999). A ComK ledisszociálását követően a ComS és a MecA szubsztrátja lesz a ClpC/ClpP proteolízisnek (Turgay et al., 1998). Így tehát a ClpC hiányában a ComK-szint drasztikusan emelkedik, míg a ClpP hiányában a MecA felhalmozódik a sejtben, és a ComK gátlódik (Turgay et al., 1997, Turgay et al., 1998, Msadek, 1999). Megjegyzendő, hogy a *clpC* gént többféle stressz (hő sokk, só- és etanol stressz, oxigén-limitáció, glükóz- és aminosav éhezés) indukálja, ami biztosíthatja azt, hogy ezen stressz-hatások folyamán (amíg a ComS nem destabilizálja a terner-komplexet) a baktérium ne lépjen a genetikai kompetenciához vezető differenciálódás útjára (Krüger et al., 1994, Msadek et al., 1994).

A ComK egy transzkripció faktor, melynek nagyon szerteágazó szerepe az alábbi pontokban foglalható össze:

- A késői kompetencia gének expressziójához aktivátorként szükséges (Dubnau et al., 1994, Mohan and Dubnau, 1990, van Sideren et al., 1995). A késői kompetencia

gének termékei közül a ComE DNS-kötő funkcióval bír, a ComG, ComA, ComB, ComC pilus-fehérjék, a ComF és a ComA pedig ATP-függő helikáz építőkövei (Chung and Dubnau, 1995, Chung and Dubnau, 1998, Dubnau, 1997, Dubnau, 1993).

- A ComK elősegíti a σ^D anti-sigma-faktorát kódoló struktúrgénnek, az *flgM*-nek az expresszióját (Liu and Zuber, 1998). Ezt a hatását Liu és Zuber hipotézise szerint elképzelhető, hogy anti-terminátorként éri el: az *flg* operontól upstream, annak közvetlen szomszédságában elhelyezkedő *comF* operon σ^A -függő promoterén az RNS-polimerázhoz köt, amely ekkor nem veszi figyelembe az operon terminátor szekvenciáját és átíródik a downstream elhelyezkedő (egyébként kizárólag σ^D -függő promoterrel rendelkező) *flg* operon is. A ComK (tehát az FlgM-en keresztül negatívan befolyásolja a σ^D -függő gének expresszióját, ezen keresztül pedig a motilitást. Ez logikus szabályozás, mivel a kompetens sejt, amennyiben nem motilis, nagyobb eséllyel tud DNS-t felvenni.
- A ComK szükséges a saját génjének a transzkripciójához (Hamoen et al., 1998). A *comK* promoterét nem-induktív körülmények között az AbrB és a CodY köti, melyek gátlása alól a promotert fel kell szabadítani a kompetencia teljes kifejlődéséhez (Serron and Sonenshein., 1996, Hahn et al., 1995). A *comK* expressziója a következő fehérjéket igényli: ComK, DegU, AbrB, SinR (van Sideren and Venema, 1994, Hahn et al., 1994). A DegU a *comK* –35 régiójától upstream köt, és elképzelhető, hogy a DNS torzulásához szükséges (Hamoen et al., 1998).
- A ComK pozitív szabályozója a genetikai rekombinációban résztvevő *recA* és *addAB* géneknek (Hajjema et al., 1995, Hajjema et al., 1996).

A ComK DNS-kötő szerepével kapcsolatban megjegyzendő, hogy a ComK mindig transzkripcionális aktivátor szerepet tölt be, valószínűleg az RNS-polimerázhoz köt. A ComK monomerek a DNS kisárkába kötnek és a nagyárokban érintkeznek egymással, melynek révén kialakulhat az aktív tetramer (Ptashne and Gann, 1997).

A kompetencia kialakulásával kapcsolatos másik fő kapcsoló fehérje a MecA, mely gátolja a kompetencia kialakulását, de szükséges a σ^D -regulonba tartozó gének expressziójához (Ogura and Tanaka, 1997, Rashid et al., 1996). Így a MecA része lehet a kompetencia és a

motilitás közti váltó rendszernek. A MecA közvetlenül és ComK-függő úton is segíti a σ^D -függő expressziót (Liu and Zuber, 1998).

A MecA további fontos szerepe, hogy közvetíti a sejt számára a tápanyag-szignált: a komplett médium MecA-függő módon gátolja a kompetencia kialakulását, viszont erősíti a σ^D -függő expressziót (Liu and Zuber, 1998).

Amennyiben a sejt molekuláris kapcsolói a motilitás irányába viszik el a sejt sorsának további alakulását, a folyamat kulcsa a σ^D , a flagellin-összeszereléséért felelős fehérjék, a kemotaxis-fehérjék és az autolizinek génjeinek promotereit felismerő alternatív szigma-faktor (Haldenwang, 1995, Kuroda and Sekiguchi, 1993, Márquez et al., 1990, Mirel et al., 1994). A σ^D aktivitás szabályozásának kulcsa az FlgM anti-sigma-faktor (Caramori et al., 1996, Fredrick and Helmann, 1996). Mint már ismertettük, ezen keresztül fejti ki negatív regulátor hatását a ComK.

A DegR szabályozó fehérje a σ^D regulon fontos tagja (a *degR* gén σ^D -függő promoterrel rendelkezik), mely részt vesz a degradatív enzimek szintézisének, illetve (közvetett úton) a genetikai kompetenciának a szabályozásában (Ogura and Tanaka, 1996). A DegR az exoproteáz-termelésre DegS/DegU-függő módon pozitív hatást fejt ki: a DegU foszforilált formáját stabilizálja (ennek jelentőségét ebben a fejezetben, de később ismertetjük) (Dahl et al., 1992, Tanaka et al., 1991, Mukai et al., 1992, Tanaka et al., 1994). A DegR 60 aminosavból áll, N-terminálisa hasonló a DegS-éhez (Nagami and Tanaka, 1986, Ogura et al., 1994).

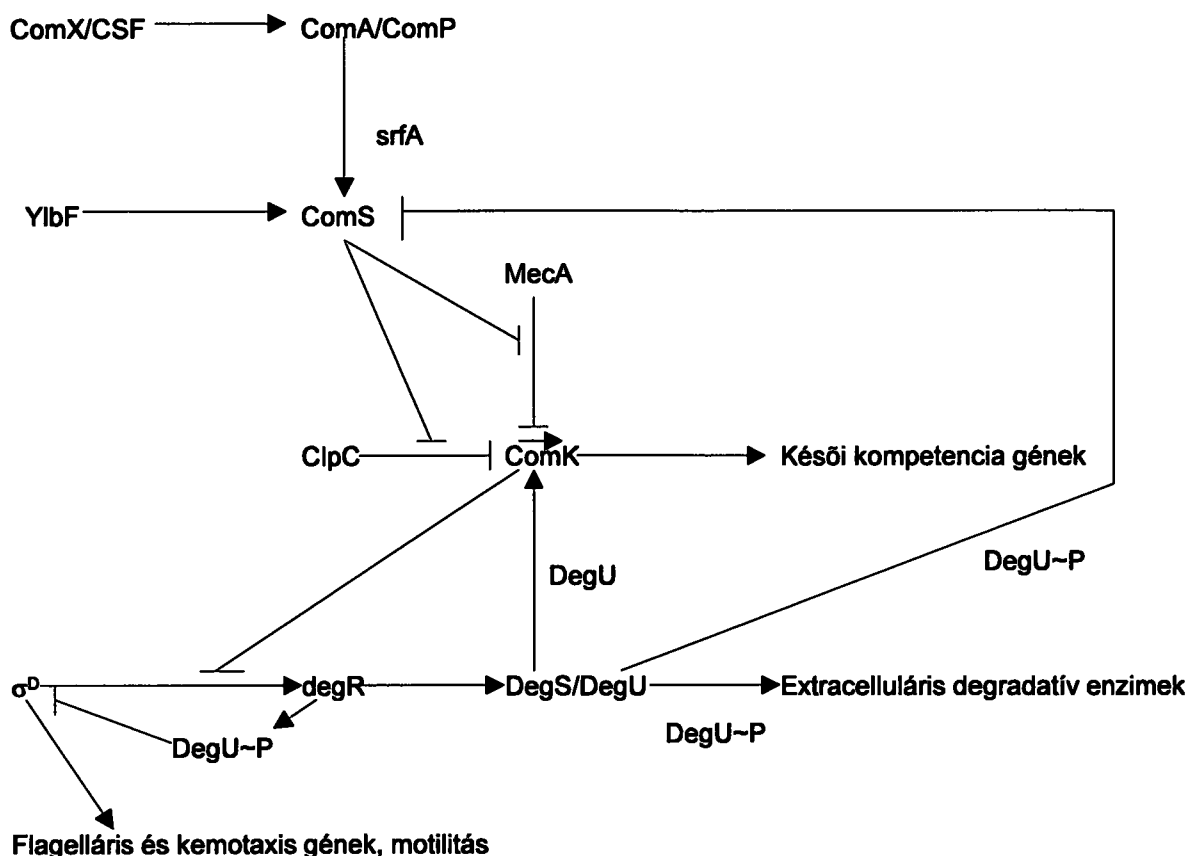
A DegS/DegU rendszer (a ComA/ComP-hez hasonlóan) egy kétkomponensű rendszer: a DegS egy hisztidin-kináz, mely képes a DNS-kötő fehérje DegU-t foszforilálni (Dahl et al., 1991, Mukai et al., 1990). A *degS* és a *degU* gén egy operont alkot (Msadek et al., 1990). A foszforilált illetve defoszforilált DegU-nak eltérő az élettani szerepe: Általánosságban megállapítható, hogy a DegU a kompetencia kialakulását segíti elő, míg a DegU~P a degradatív enzimek szintéziséhez szükséges (Msadek et al., 1993). (A *B. subtilis* összesen kb. 150 – 180 féle extracelluláris fehérjét szintetizál (Hirose et al., 2000)).

Tekintettel arra, hogy jelen munkában a DegS/DegU rendszer fontos helyet foglal el, indokolt, hogy további jellemzésüket egy külön, a kétkomponensű rendszerekkel foglalkozó fejezetben folytassuk.

A fentiekben ismertetett szabályozó kört (az áttekinthetőség kedvéért vázlatosan) a 2. ábra szemlélteti.

2. ábra

A genetikai kompetencia és a σ^D -függő folyamatok szabályozása



Az ábrán a nyilak pozitív (aktiválás) a tompa végű vonalak pedig negatív (gátlás) befolyásolást jelölnek.

1.2.4 A kétkomponensű rendszerek

A kétkomponensű rendszerek a baktériumok között igen elterjedtek. Közös jellemzőjük egy jel-érzékelő hisztidin-kináz és az ezáltal szabályozott szabályozó fehérje, amely speciális gén expressziós mintázatbeli változást okoz (Hoch and Silhavy, 1995). A kétkomponensű rendszerek a legnagyobb ismert bakteriális szabályozó fehérjék családját alkotják, bár hasonló fehérjéket találtak eukariótákban is (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*) (Chang and Meyerowitz, 1994).

Legáltalánosabb formája a kétkomponensű rendszereknek, hogy a jelérzékelést, a jel-átvitelt és a transzkripciót befolyásoló szabályozó funkciót két fehérje hordozza (Msadek et al., 1999). A jelátviteli foszfo-transzferben közreműködő modulok (a hisztidin kináz C-terminális és a szabályozó fehérje N-terminális doménje) konzervatívok, míg a jelérzékelésért és a transzkripcionális szintű válaszáért felelős modulok (a hisztidin kináz N-terminális és a szabályozó fehérje C-terminális doménje) variabilisek (Appleby et al., 1996). A kétkomponensű rendszerekben a szabályozás legalább 3 szintet foglal magában: egy környezet-fehérje szintet (jelérzékelés), egy fehérje-fehérje szintet (jelátvitel) és egy fehérje DNS-szintet (szabályozás - aktivátor vagy represszor hatás) (Msadek et al., 1999). A fenti „egyszerű” rendszertől lényegesen eltér a sporuláció iniciációjában szereplő foszfo-relé rendszer, mely esetben további modulok szerepelnek (Hoch, 1993). A sporuláció folyamatának részletezésétől azonban, mivel közvetlenül nem kapcsolódik munkákhoz, és – tekintettel a folyamat összetettségére – a részletezés csupán nagy terjedelemben lenne lehetséges, eltekintünk. Ennél a pontnál azonban annyit szükséges megjegyezni, hogy az iniciáció kulcsa a Spo0A fehérje, melyet egy négylépéses folyamat foszforilál. A folyamatban részt vesznek a KinA, KinB és KinC kinázok, a Spo0F foszfo-akceptor szabályozó fehérje és a Spo0B foszfo-transzferáz. A Spo0A~P aktiválja a sporulációs folyamat kezdeti lépéseiben részt vevő gének transzkripcióját és gátolja az *abrB* gén expresszióját. A fentiek részletesen Spiegelmann és munkatársai munkájában olvashatók (Spiegelmann et al., 1995). A Spo0A~P *abrB* gátló hatásának következménye, hogy (a fentiekben már ismertetett módon, mivel a *comK* transzkripciójához szükséges az AbrB fehérje) a ComK gátlása révén gátolja kompetencia kifejlődését és lehetővé teszi a degradatív enzimek szintézisét. Fontos továbbá, hogy a RapA, RapB és RapE foszfatázok specifikusan képesek a Spo0F~P-t defoszforilálni ily módon gátolva a sporuláció iniciációját. A *rapA-phrA* operon (mely a Rap-foszfatázokat, a PhrA-t és a CSF-et kódolja) expressziójához szükséges a ComA~P, mely tehát (a Rap-foszfatázok és az ezek aktivitásához szükséges Phr-fehérjék révén) gátolja a sporulációt (Perego, 1998, Jiang et al., 2000).

A foszfát-metabolizmust, a respirációt és a sporulációt szabályozó kétkomponensű rendszerek egymással való kapcsolata jó példa ezek hálózatszerű működésére *Bacillus subtilis*-ben. Ezekben a folyamatokban három kétkomponensű rendszer vesz részt: a PhoP (szabályozó fehérje) / PhoR (kináz), a ResD (szabályozó fehérje) / ResE (kináz) és a Spo0A (Hulett, 1996, Sun et al., 1996a). A PhoP foszfát-limitáció hatására foszforilálódik (Hulett, 1996). A Pho~P pozitív szabályozója a PhoP/PhoR szintézisének, a foszfát felvételéért és felhasználásáért felelős fehérjéket kódoló gének expressziójának és a ResD/ResE szintézisének (Hulett, 1996, Sun et al., 1996a, Msadek et al., 1999). A ResD~P pozitív szabályozója a ResD/ResE szintézisnek, szükséges az aerob és anaerob respirációhoz, és

a *phoPR* operon foszfát-limitáció hatására bekövetkező indukciójához (Sun et al., 1996a, Nakano and Zuber, 1998, Msadek et al., 1999). Az AbrB pozitív szabályozója a *phoPR* expresszióknak (Sun et al., 1996b). A Spo0A~P két különböző szinten gátolja a Res és a Pho regulont: gátolja a ResD és ResE szintézisét, illetve közvetetten, az AbrB szintézisének gátlása révén gátolja a *phoPR* expresszióját (Hulett, 1996, Sun et al., 1996a). Így tehát sporulációkor ez a két regulon gátolt.

A kemotaxist irányító kétkomponensű rendszer a CheA (hisztidin-kináz) / CheY (szabályozó fehérje), melyeket kódoló struktúrgének promoterét a σ^D ismeri fel (Msadek et al., 1999).

Azt a korábbi dogmát, hogy a szabályozó fehérje foszforilált alakja lehet csak aktív, megdöntötte a DegS/DegU rendszer, ugyanis (mint azt már a genetikai kompetencia leírásánál ismertettük) a DegU és a DegU~P is aktív, bár más-más élettani hatást fejtenek ki. (Ehhez hasonlóan a *Pseudomonas aeruginosa* AlgB és AlgR szabályozó fehérjei is aktívak nem foszforilált formájukban (Ma et al., 1998)). Az alábbiakban részletesen foglalkozunk a DegU és a DegU~P élettani szerepeivel.

A DegU~P élettani hatásai a *degU* gén Hy alléljét hordozó törzsön vizsgálhatóak a legjobban, mivel az allél által kódolt fehérje szerkezetéből adódóan a DegU~P felhalmozódik a baktériumban. A vizsgálatok alapján a felhalmozott DegU~P élettani hatásai a következők voltak: glükóz jelenlétében sporulációra való képesség, a genetikai kompetencia gyenge kifejlődése, filamentózus sejt-morfológia, flagella- és motilitás-vesztés, nagy mennyiségben szekretált extracelluláris degradatív enzim (Ayusawa et al., 1975, Henner et al., 1988, Msadek et al., 1990, Sekiguchi et al., 1975, Tanaka and Kawata, 1988). A DegU~P az *srf* gátlásán keresztül gátolja a kompetencia kifejeződését (Dubnau, 1991, Hahn and Dubnau, 1991, Msadek et al., 1993). A DegU~P a *sigD* (a σ^D struktúrgénje) erős negatív szabályozója (Tokunaga et al., 1994). A DegU~P általi gátlás biztosíthatja, hogy a jelentős mennyiségű extracelluláris enzimet szekretált sejt helyben „várja meg” enzimeinek „gyümölcsét”: a felvehető tápanyagot.

A defoszforilált DegU a késői kompetencia gének expressziójához szükséges (Dubnau, 1993, Roggiani et al., 1990). A defoszforilált DegU nem befolyásolja a motilitást (Msadek et al., 1993).

A DegU~P a baktériumok rázatott tenyészetében alkalmazott 1,5 M NaCl stressz esetén növeli a sejtek túlélési esélyét (Ruzal and Sanchez-Rivas, 1994, Ruzal and Sanchez-Rivas, 1998). Ezért sem meglepő, hogy a DegS/DegU rendszer NaCl stressz esetén bizonyítottan befolyásolja némely gén sóstressz alatti expresszióját, bár esetenként ellentétes módon: a levánszukráz enzimet kódoló *sacB* gén sóstressz esetén kb. 9-szeres expresszió-

növekedést mutat (a stressz-mentes, nyugalmi szinthez viszonyítva), mely indukció igényli a DegS/DegU rendszer jelenlétét (Kunst and Rapoport, 1995). A sejtfal-asszociált fehérjét kódoló *wapA* gén expresszióját ezzel szemben a DegS/DegU rendszer negatívan befolyásolja (Dartois et al., 1998). A gátlást a kétkomponensű rendszer a foszforilált DegU-n (DegU~P) keresztül hajtja végre (Dartois et al., 1998). Mivel a *B. subtilis* egy fontos sejtfal-asszociált fehérjéjének (WapA) koncentrációját a DegS/DegU rendszer befolyásolja, nem volt kizárható, hogy a baktériumok sejtfelszíni töltés-megoszlási viszonyaira, ezen keresztül pedig kitapadási képességére is befolyással legyen. Ez a felvetés amiatt is megalapozottnak tűnt, mivel néhány vizsgálat nyomán bizonyítást nyert, hogy némely baktérium species esetében különböző stresszhatásokra megváltozik a sejtek hidrofilitása, tehát egy olyan több tényező befolyása alatt álló tulajdonsága, mely alapvetően meghatározza a sejtek kitapadási jellemzőit. Így például bizonyították, hogy sav-stressz esetén a Gram negatív *Salmonella typhi-murium* felszíne hidrofóbabb lesz (Leyer and Johnson, 1993). Gram pozitív baktériumok esetében *Azospirillum* spp.-en vizsgálták a sejtfelszíni hidrofilitás és a stresszhatások közti összefüggést. Különböző antibiotikumokkal kezelték, illetve hő sokknak tették ki a sejteket, és azt tapasztalták, hogy a sejtek felszíne hidrofóbabbá vált, illetve (némely antibiotikummal való kezelés esetén) nem változott (Castellanos et al., 1997). Ezzel a tanulmánnyal kapcsolatban megjegyzendő, hogy az általuk használt számítási rendszer nem volt alkalmas a sejtfelszín hidrofílebbé válásának mérésére (mivel az ilyen irányú változást 0-nak vették) illetve sajnos kinetikai elemzést nem végeztek. *Bacillus subtilis*-ben ilyen jellegű vizsgálatokat eddig még nem folytattak.

2 Célkitűzések

Munkánk során az alábbi kérdésekre kívántunk választ találni:

1. Mi az a sejten belüli jel, ami mindenképpen előfeltétele a σ^B regulon aktiválásának? Ezt a jelet a következőkben közvetlen jelnek nevezzük, mivel valószínűleg a σ^B aktivitását szabályozó mechanizmusban a σ^B közvetlen környezetében hat (mindenképpen a downstream modul működését befolyásolja).
2. Van-e olyan stressz-körülmény, amely esetében a σ^B regulon növeli a baktériumok életképességét (mi a σ^B szerepe)? Feltételezhető volt, hogy amennyiben sikerül megismernünk a közvetlen jel természetét, választ találhatunk erre a kérdésre is.

3. Hogyan változik a *Bacillus subtilis* sejtfelszíni hidrofilicitása stresszhatások esetén? Mivel *Salmonella typhi-murium*-ban és *Azospirillum* spp.-ben stresszhatásokra adott válaszként megváltozott a sejtek felszínének hidrofilicitása, valószínűsíthető volt, hogy *Bacillus subtilis*-ben is létezik ez a fajta, sejtfelszíni szintű stresszválasz.
4. Amennyiben sikerül megfigyelni sejtfelszíni szintű stresszválaszt megvizsgálandó, hogy milyen főbb szabályozó mechanizmusok játszhatnak szerepet a hidrofilicitás-változás kiváltásában? Erre nézve a különböző stressz fajták esetén megfigyelt hidrofilicitás-változások mértékéből és kinetikájából reméltünk információt kapni.
5. Mi a sejtfelszíni hidrofilicitás-változások élettani szerepe?

3 Anyagok, módszerek

3.1 Vegyszerek

A vegyszerekkel szemben támasztott minimális követelmény a "pro analysii" tisztaság volt. A vegyszereket Serva Heidelberg-től, a Merck Darmstadt-tól vagy a Reanal-tól vásároltuk, az alábbi kivételekkel:

Agaróz	BRL Life Technologies Inc.
Blocking-reagens	Boehringer Mannheim GmbH
Kloroform (a nukleinsav munkákhoz)	Feinchemie KG Sehnitz
CSPD	Tropix
DEPC	Fluka AG
Dezoxiribonukleotidok	Pharmacia
EDTA	Boehringer Mannheim GmbH
Etidium-bromid	Roth GmbH
Izoamil-alkohol	POC G liwice
Lauroylsarcosin	Sigma Chemical Company
Metanol (HPLC-hez)	Sigma Chemical Company
MOPS	Roth GmbH
Fenol (RNS munkákhoz)	Appligene
Tris	Fluka AG

A jelen munka során használt ionoforokat, a purin-bioszintézis gátlószereit illetve a 2,4-DNP-t a Sigma Chemical Company-tól vagy a Merck Chemical Company-tól vásároltuk.

3.2 Enzimek

<i>Lizozim</i>	Merck Darmstadt
<i>PstI</i>	New England Biolabs

3.3 Kitek

Geneclean KitII	Dianova Hamburg
Prep-a-gene Kit	Biorad
DNS-jelölőkit	Boehringer Mannheim GmbH
Kit CLS (Luciferáz-assay-hez)	Boehringer Mannheim GmbH

3.4 Tenyésztési és stresszkörülmények

3.4.1 A törzsek tárolása

A baktériumtörzseket 2 cm³ nagyságú steril műanyag csövekben tároltam -80 °C hőmérsékleten, kb. 20 (v/v) % glicerinben. A kísérletekhez kizárólag a törzsekre jellemző markerekre bevizsgált kultúrákat használtam.

3.4.2 Tenyésztési körülmények

Az overnight (ON) –kultúra a baktériumok 5 – 7 fokozatú 10-es hígítási sorából állt. A hígítás a későbbiekben használni kívánt tápoldattal történt. Ebből a hígítási sorból kémcsövenként 5 ml-t ráztam 37 C°-on. A használt kémcsöveket fém –kupakkal (σ^B -munkák) vagy vattadugóval (többi munka) zártam le. Ezekből a kémcsövekből logaritmikus fázisú kultúrát (0.2-0.9 OD₅₅₀) 200 ml-nél nem több tápoldatba oltottam, amelyet 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban 37 C° ráztam. Az oltásnál arra törekedtem, hogy a kultúrát kb. 0.05 optikai denzitásra állítsam be.

3.4.3 Sejtszám-meghatározás

A kultúrákból a sejtszámot turbidimetriásan mértem 550 nm hullámhosszon, Pharmacia-spektrofotométerrel (σ^B -munkák), illetve GBC U V/Vis 918 spektrofotométerrel (többi munka). Lemezen a sejtszámot a klasszikus hígítási – telepszámlálási módszerrel határoztam meg 3 párhuzamosban. A standard deviancia $\pm 8\%$ volt. A kísérleteket 5 – 9-szer végeztem el.

3.4.4 Stresszkörülmények

A baktériumokat közép-logaritmusos fázisig növesztettem (kb. $OD_{550} = 0.5$), ekkor kezeltem a kultúrát az adott stresszszorral.

3.4.4.1 2,4-Dinitrofenol

150 μM végkoncentrációban a σ^B -kísérletekhez.

300 μM végkoncentrációban a sejtfelszíni hidrofilitás-kísérletekhez.

Törzsoldat: 0,1 M, 96 % etanolban oldva.

3.4.4.2 Mikofenolsav

0,045 μg / ml végkoncentrációban alkalmazva.

Törzsoldat: 19,15 μg / ml, etanolban oldva.

3.4.4.3 Decoyinin

1 mg / ml végkoncentrációban alkalmaztuk.

Törzsoldat: 250 mg / ml, 1 N KOH-ban oldva.

3.4.4.4 Adenozin

1,2 mM-os végkoncentrációban alkalmazva.

Törzsoldat: 0,15 M, 1 N KOH-ban oldva.

3.4.4.5 Guanozin

1,2 mM-os végkoncentrációban alkalmazva.

Törzsoldat: 0,15 M, 1 N KOH-ban oldva.

3.4.4.6 Valinomicin

10 µg / ml végkoncentrációban.

Törzsoldat: 40 mg / ml, acetonban oldva.

3.4.4.7 Puromicin

10 µg / ml végkoncentrációban alkalmazva.

Törzsoldat: 10 mg / ml, bidesztillált vízben oldva.

3.4.4.8 Sav-stressz

A tápfolyadékot (bipufferolt Belitzky MM) a kívánt pH-értékre megfelelő mennyiségű 1 N HCl hozzáadásával titáltam.

A növekedési kísérletekben a tápfolyadék pH-értékét előre beállítottam. Ekkor a következő pufferokat használtam (részletesen leírva a tápfolyadékok ismertetésénél): pH =7,5 – 6,5: MOPS, pH < 6,5 – 4,0 Na₃citrát/citromsav

3.4.4.9 KOH-stressz

A KOH törzsoldat 1 N volt. A bemért mennyiséget az „Eredmények” rész aktuális fejezete ismerteti.

3.4.4.10 Etanol kísérletek

A törzsoldat 96 (v/v) % volt. A bemért mennyiséget az „Eredmények” rész aktuális fejezete ismerteti.

3.4.4.11 Foszfát-éhezés, foszfát-limitáció, glükóz-limitáció

A Belitzky-minimálmédiumban exponenciálisan növekvő kultúrákat két részre osztottam és lecentrifugáltam (6000 rpm, 5 min.). Az egyik részt az eredeti tápfolyadékban reszuszpendáltam kontrollként, a másikat pedig az éheztető/limitációs tápfolyadékban reszuszpendáltam. Foszfát-éhséghez a tápfolyadék nem tartalmazott KH_2PO_4 -ot. A foszfát-limitációs tápfolyadék 20 mM KH_2PO_4 -ot tartalmazott. A glükóz limitációs médium 0.02 % (w/v) glükózt tartalmazott.

3.4.4.12 Oxigén-limitáció

Az O_2 -limitáció kiváltásához a sejtek rázatását megszüntettem.

3.4.4.13 NaCl-stressz

A NaCl-ot 6 (w/v) % végkoncentrációban használtam.

Törzsoldat: 24 (w/v) %.

3.4.4.14 Hősokk

A hősokk kiváltásához a sejteket 45 °C vízfürdőbe helyeztem, és a rázatást itt folytattam.

3.5 Felhasznált törzsek

Jelen munka során az alábbi *Bacillus subtilis* törzseket használtam fel:

IS58 (*trp*, *lys*)

168 (*trp*)

ML6 (*trp*, ΔsigB); Hivatkozás: Völker et al., 1994.

QB4487 (*trp*, ΔdegU); Hivatkozás: Dartois et al., 1998.

1056 (*trp*)

A molekuláris genetikai munkákhoz az *Escherichia coli* DH5 α törzsét használtam fel.

3.6 Tápfolyadékok-táptalajok

3.6.1 Módosított Belitzky-Minimálmédium

0,015 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,008 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,027 M KCl

0,007 M $\text{Na}_3\text{Citrát} \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,050 M Tris

A pH-t 1 N HCl-el 7,50-re állítottam be

3.6.2 MOPS-pufferolt minimálmédium

Mint a Belitzky-minimálmédium, de a Tris-t 0,050 M MOPS-al helyettesítettem. A pH-t 1 N HCl-el 7,50-re, 7,00-re vagy 6,50-re állítottam be.

3.6.3 $\text{Na}_3\text{Citrát}$ /Citromsav-pufferolt minimálmédium

0,015 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,008 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,027 M KCl

0,025 M $\text{Na}_3\text{Citrát} \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,025 M Citromsav

A tápfolyadékot a 6,50-4,50 pH-tartományban használtam, a kívánt pH-értéket megfelelő mennyiségű 1 N HCl vagy 1 N NaOH hozzáadásával értem el.

3.6.4 Bipufferolt minimálmédium

0,015 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,008 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,027 M KCl

0,0125 M $\text{Na}_3\text{Citrát} \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,0125 M Citromsav

0,025 M Tris

A pH-t 1 N HCl-al 7,50-re állítottam be.

A fenti tápoldatokat autoklávban sterilizáltam és +4 C^o-on tároltam.

3.6.5 A minimálmediumok kiegészítése

A minimálmediumokat a következőképpen szupplementáltam:

0,200 M KH₂PO₄ (autoklávozott)

1,000 M CaCl₂ x 2H₂O (autoklávozott)

0,0005 M FeSO₄ x 7H₂O (szűrt)

0,025 M MnSO₄ x 4H₂O (szűrt)

0,500 M Glutaminsav (pont-autoklávozott)

0,039 M L-Triptofán (szűrt)

0,043 M L-Lizin-HCl (autoklávozott)

20% (w/v) Glükóz (pont-autoklávozott)

Kivételek:

Foszfát-éheztetés, foszfát-limitáció és a glükóz-limitáció: mint fent, kivéve, hogy a KH₂PO₄ illetve a glükóz koncentráció a stresszkörülményeknél ismertetett volt.

A 168-as törzs, az ML6 és a QB4487 törzsek valamint az 1056-os törzs esetében nem adtam a tápoldathoz lizint. (Megjegyzés: a QB4487 tárolásához a fenti minimálmediumot használtam, viszont az ezzel a törzsszel végzett valamennyi kísérletben az LB-tápfolyadékban szaporítottam fel a baktériumokat).

3.6.6 LB (Luria-Bertani) - tápfolyadék

10,0 g Bacto Trypton

5,0 g Bacto-yeast extract

10,0 g NaCl

Feltöltve 1,0 l-re.

3.6.7 LB (Luria-Bertani) – táptalaj

Mint az LB-táptalajt, csak még 12 g agarral szilárdítva.

3.7 A *sigB* és a *gsiB* gének transzkripció-analízise

3.7.1 A *sigB*-mRNS próba előállítása

A *sigB*-próbát köszönettel Susanne Engelmann bocsátotta rendelkezésemre.

3.7.2 A *gsiB*-mRNS próba előállítása

3.7.2.1 A DNS gélelektroforézise

Ha az agaróz gél két pontja között feszültséget létesítünk, a DNS a töltésének megfelelően, a + pólus irányába vándorol. A molekulák vándorlásának sebessége azok méretétől, illetve szuperspiralizáltságuk fokától függ. Ezen tulajdonságok alapján a különböző méretű DNS molekulák egymástól elválaszthatók: minél kisebb vagy szuperspiralizáltabb a DNS molekula, annál gyorsabban vándorol. A módszer segítségével a lineáris és a cirkuláris formák egymástól elválaszthatóak: a cirkuláris forma gyorsabban vándorol. A gélelektroforézist 0,8%-os agaróz-gélben TBE-pufferrel végeztem, jelzőfestékként brómfenolkéket használtam. A mintát 0,1 volumen felvívó-pufferben vittem fel. Minden futtatásnál –a fragment méretének ellenőrzéséhez– DNS standardot vittem fel. A DNS láthatóvá tételéhez az interkalálódó etidium-bromidot használtam, amely UV-fényben fluoreszkál. A gélek elválasztási mintázatáról Biomed Fullerton video-denzitométerről készítettem képet.

10xTBE

108 g Tris

55 g Borsav

40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

1 l-re desztillált vízzel feltöltve, a pH 8,3-ra beállítva.

0,8%-os agaróz-gél

1,6 g agaróz 200 ml TBE-ben

Felvívő-puffer

0,05% Brómfenolkék

0,05% Xilén-cianol

60%-os szukrózoldatban

DNS-standard

λ DNS*HindIII+EcoRI (21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125)

3.7.2.2 Plazmidok felszaporítása és izolálása

A pKsmgsiB1 plazmidot hordozó *Escherichia coli* DH5 α gsiB1 törzset köszönettel Björn Maul bocsátotta rendelkezésemre. A plazmid térképét mutatja be a 3. ábra. A 100 mg / l ampicillinint tartalmazó ON-kultúrából Prep-a-gene kittel izoláltam DNS-t. Ez igen kiméletes eljárás, mely azon alapul, hogy a plazmidot a töltése révén oszlopra kötjük, majd eluáljuk. Az izolálás a gyártó cég előírásai alapján történt. Az izolált DNS koncentrációját gélelektroforézissel becsültem meg: a DNS-ből 5 lépcsős felező hígítást készítettünk, és azt a DNS-csíkot, mely UV-fényben még éppen látszott 50 ng mennyiségnek becsültem. A futtatás 160 V feszültségen 50 percig történt.

3.7.2.3 Az izolált DNS linearizálása

A hasításhoz szükséges enzim mennyiségét az alábbi képlet alapján számítottam ki:

$IU \mu g^{-1} DNS h^{-1} = G_1 \times n_f \times (G_f \times n_1)^{-1}$, ahol:

G_1 : A Fág1 genom-nagysága kB-ban (48 kB)

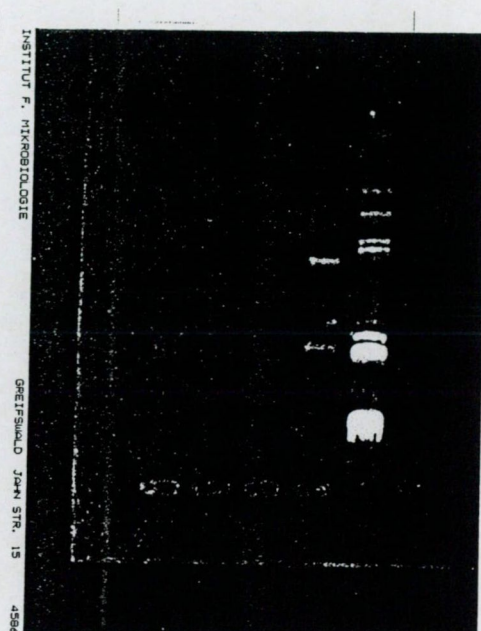
G_f : A hasítandó fragment nagysága kB-ban

n_1 : Az enzim hasítóhelyeinek száma az 1-es genomban

n_f : Az enzim hasítóhelyeinek száma a hasítandó fragmentben

A hasító-elegy összeállításánál figyelembe vettem, hogy az enzim mennyisége a 10 (v/v) %-ot ne haladja meg, mert ekkor az enzim tárolásához használatos glicerinnel gátolt koncentrációt érne

A linearizált plazmid kinyerése preparatív gélelektroforézissel



A **4. ábrán** a baloldalra a restrikciós elegyet, a jobboldalra pedig a standard DNS-t vittem fel. A baloldali sávok, alulról felfelé: lineáris dimer forma, lineáris forma (kivágva), cirkuláris forma.

3.7.2.5 *In vitro* transzkripció

Az *in vitro* transzkripciót a DNS-jelölő kittel végeztem, a gyártó útmutatásai alapján. A felhasznált enzim a T3 RNS-polimeráz volt. A digoxigenin-jelzett timidint is tartalmazó elegyhez 1 µg lineáris plazmidot mértem. (Az elv: a T3 promoterről elindult transzkripció a *Pst*I által elhasított helyen megáll). A próba koncentrációjának megállapításához 6 fokozatú tizedelő hígítást készítettem a próbából, és a koncentrációt dot-blot módszerrel becsültem meg. A próbát hibridizációs oldatban (36. oldal) -20 C°-on tároltam.

Megjegyzendő, hogy *gsiB* próbát korábban Uwe Völker és Björn Maul is előállított ugyanebből a plazmidból ugyanezzel a módszerrel. Tekintettel arra, hogy ugyanezt a módszert használtam, és az Uwe Völker által köszönettel rendelkezésünkre bocsátott, egy hibridizálásra elegendő *gsiB* próbát és az általunk előállított *gsiB* próbát összehasonlítottam, és ezek eredménye között szignifikáns eltérést nem tapasztaltam, eltekintettem a próba vissza-szekvenálásától.

3.7.2.6 Össz-RNS izolálás

Az alábbiakban leírásra kerülő módszer a DNS és RNS savas fenol-fázisban való extrahálhatóságának különbségét használja ki: míg az RNS a vizes fázisban marad, addig a DNS a fenol-fázisba megy át.

A kultúra 10-15 ml-ét összetört killing-jégre pipettálással ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztott killing-puffer) a sejteket pillanatszerűen megöltem, majd killing-pufferes mosás – centrifugálás után a baktériumokat 1 ml lízis-puffer I-ben reszuszpendálva 1 mg lizozim hozzáadásával protoplasztot készítettem (5 perc jégen). A protoplasztokat $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lecentrifugáltam, majd $300\text{ }\mu\text{l}$ lízispuffer II-ben reszuszpendáltam. A sejtfeltárás a fenti elegynek $300\text{ }\mu\text{l}$ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os lízispuffer III-hoz mérésével és pontosan 5,0 perc $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on folytatott inkubációval történt. Ezt követően háromszor PCI-ben extraháltam a feltárt sejteket. A fenol denaturálta a fehérjéket, de egy kis mértékű RN-áz aktivitás még megmaradt. A kloroform a fennmaradó RN-áz aktivitást is megszüntette és segítette a két fázis szétválását. Az izoamilalkohol gátolta az extrakció alatti emulzió-képződést. A fenol nyomokat kétszeri kloroform-izoamilalkoholos extrakcióval távolítottam el. Az egyszeri dietil-éteres extrakció eltávolította a kloroform nyomokat. Az extrakciókat 1 vol. oldattal végeztem. Ezt követően az étert $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on elpárologtattam, majd 2,5 vol. 96 (v/v) % etanollal, 0,1 vol. Na-acetát jelenlétében az RNS-t $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán keresztül kicsapattam. A kicsapathoz gyorsabb eljárás lett volna $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartani az RNS-t 30 percig, ezt a módszert azonban az RNS-el együtt kicsapódó szennyezők nagyobb mennyisége miatt nem alkalmaztam. Ezt követően az RNS-t 1 vol. etanollal mostam, óvatosan vákuum-szárítottam, majd 1 vol. steril, kvarcdesztillált aq. bidest.-ben felvettem. A mintát felhasználásig – $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam. Figyelembe véve a kontroll-érték fontosságát, minden esetben két párhuzamos kontrollt izoláltam.

Killingpuffer

20 mM Tris/HCl pH 7,5

5 mM MgCl_2

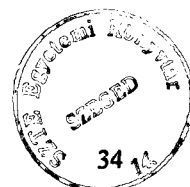
20 mM NaN_3

Lízispuffer I:

25% szukróz

50 mM Tris/HCl pH 8,0

0,25 mM EDTA



LízispufferII

3 mM EDTA

200 mM NaCl

LízispufferIII

3 mM EDTA

200 mM NaCl

1% SDS

Fenol: kirázva 0,1%-os DEPC-vízzel

Éter: kirázva 0,1%-os DEPC-vízzel

PCI: Fenol-Kloroform-Izoamilalkohol 25:24:1

Kloroform- Izoamilalkohol 24:1

DEPC-víz: 1 ml Dietil-Pirokarbonát oldva 1 l aq. bidest-ben. Egy éjszakán keresztül 37 °C –on állni hagytam, hogy a felesleges DEPC CO₂ formájában távozhasson, és eztán autoklávban sterilizáltam.

3.7.2.7 Az izolált RNS koncentrációjának meghatározása

A nukleinsavak 260 nm hullámhossznál rendelkeznek elnyelési maximummal. Az $A_{260}=1$ érték megfelel 50µg dsDNS-nek, 40µg ssDNS-nek vagy RNS-nek vagy 20µg oligonukleotidnak ml-enként.

Az RNS koncentrációt UltrospecIII (Pharmacia) spektrofotométerrel, beépített program segítségével mértem. A program a 260 nm-en mért abszorbanciából kiszámítja az RNS koncentrációját, és a 260 nm-en mért fényelnyelést a 280 nm-en (a fehérjék elnyelési maximuma) mérttel összehasonlítva kiszámítja az RNS tisztaságára jellemző faktort. A méréshez kvarcdesztillált aq. bidest.-et használtam.

3.7.2.8 Slot-blotting (az RNS membránra kötése)

A slot-blot módszer lehetőséget nyújt kvalitatív és kvantitatív analízisre is: tesztelhető, hogy a

vizsgált mRNS jelen van-e az adott mintában, és ha igen, akkor a kontrollhoz viszonyítva milyen mennyiségben. Az eljárás során a mintákból 6 fokozatú felező hígítást készítettem 10 x SSC-ben, majd 65 °C –on 10 percig denaturáltam azokat. Az azonnali jégre helyezés és a magas ionerősség megakadályozta az RNS renaturálódását. Ezután a slot-blotting készüléket előírás szerint összeszereltem, majd aq. bidest.-el és 20 x SSC-vel előkezelt, pozitívan töltött membránt (Hybond -N+, 2.0-s változat, gyártó: Amersham Life Science) helyeztem bele. Ezután egy vízszűrő-pumpával a készülékben vákuumot létesítettem, melynek segítségével a mintákat a membránra szívattam. Az RNS-t 120 perc sütéssel 80 °C-on rögzítettem.

20xSSC

3,0 M NaCl

0,3 M Trinátrium-citrát

HCl-el pH 7,0-re beállítva

3.7.2.9 Hibridizálás

A membránt hibridizáló oldattal 68 °C-on legalább 1 h-ig elő-hibridizáltam hibridizáló kemencében. Ezt követően a próbát 95 °C-on 15 percig denaturáltam, majd –a renaturálódás megakadályozása végett– rögtön –20 °C-os jégre helyeztem. A membránra kötött RNS-t a hibridizáló kemencében 68 °C-on 12 – 16 óráig hibridizáltam a próbával. Ezt követően szobahőmérsékletű 2 x SSC + 0,1 % SDS oldattal, majd 68 °C hőmérsékletű 0,2 x SSC + 0,1 % SDS oldattal mosva eltávolítottam a szennyező DNS-t.

Hibridizáló oldat

0,1% (v/v) Lauroil-szarkozin Na-só

50% (v/v) Formamid

7% (w/v) SDS

5 x SSC

2% (w/v) blokkoló reagens

50 mM foszfátpuffer (pH 6.50)

steril aq. bidest.-ben, -20 °C-on tárolva

3.7.2.10 A nem radioaktívan jelölt RNS detektálása

A digoxigenin, amelyet az RNS próba jelöléséhez használtam, egy haptén, a *Digitalis lantana*-ból származó Lantanosid C nevű glikozid aglikonja. Haptén-természetéből adódóan, az ily módon jelölt RNS immunológiailag detektálható. A detektálás a hapténizált próbának alkalikus foszfatázzal konjugált anti-digoxigenin-fab-fragmenthez kötése által történt. Az alkalikus foszfatáz defoszforilál egy fluorescens szubsztátot (esetünkben a CSPD-t), mely fényemissziós intermediér terméké alakul. Az emissziót Röntgen-filmmel (Fuji Foto Film Company Inc.) dokumentáltam. A detektálást a jelölő kit gyártójának útmutatásai alapján végeztem.

3.7.2.11 A Röntgen-filmek denzitometriás kiértékelése

A filmekről Personal Densitometer-el (Molecular Dynamics) készítettem digitális képet, az alábbiakban leírt módon. Egy Helium-Neon-lézer szisztematikusan letapogatta a filmet, mely részei eltérő módon abszorbeálták a lézersugarakat. Az abszorbanciát egy fényintegráló gyűjtőhenger regisztrálta, majd egy foto-sokszorozó a jelet elektromos árammá alakította, mely egy áram-feszültség konverter révén feszültséggé alakult. Az analóg jelet egy analóg-digitális konverter digitális jellé alakította, mely bitek formájában nagy kapacitású mágneses tárolón tárolódott. Az ilyen módon leképzett film megfelelő szoftverekkel kiértékelhető. A kiértékelés az Image Quant nevű programmal történt. A program a filmen a (fluoreszcencia által létrehozott) denzitást görbévé alakította, majd integrálta. Ezt követően kiszámította a lokális háttér-denzitást, melyet az előző értékből levont. Az így kapott adatokat visszaszámoltam egységnyi felvitt RNS-re, majd minden értéket a kontrollra vonatkoztattam. Amely kezelésnél ez szükséges volt, az előzőekben kiszámolt értékeket elosztottam az oldószer-kontroll izolációból származó értékekkel. A számításokat a Microsoft Excel programmal végeztem. A kísérletek közül csak azokat tartottam kiértékelhetőnek, melyek párhuzamosan izolált két kontrollja $\pm 4\%$ -on belül egymással identikus volt, és csak azon kapott értékeket megbízhatónak, melyek hígítási sorozatainak legalább két értéke a lineáris denzitási tartományba esett. Meghatároztam a módszerre jellemző standard devianciát, mely $\pm 4\%$ -nak adódott. Csak az ezen belüli értékek szerepelnek jelen értekezés „Eredmények” című részében. Minden mérést 5 – 9 esetben végeztünk el. Abban az esetben, ha valamely adatpont értékeinek többsége a 9. mérés esetében sem esett a standard deviancia által megszabott határok közé, az adatpont jellemzése elmaradt.

3.8 A sejtek ATP-pooljának meghatározása

3.8.1 Nukleotid-extrakció *Bacillus subtilis*-ből (TCA-módszer)

A módszer alapja az, hogy a TCA-tartalmú feltáró oldat a sejtfalet és a membránt –azokkal reagálva- megtámadja, míg a nukleotidokkal nem reagál. A feltárás a következőképpen történt: 120 µl feltáró oldathoz 100 µl kultúrát adtam $OD^{550} = 1,0$ mennyiségben, majd a nukleotidokat 15 percig jégen extraháltam. Az extrakciót 100 µl mintának 900 µl pirogénmentes, steril (Ph. Eur.) vízben történt hígításával állítottam le. A mintákat a luminometriás mérésekig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

Feltáró oldat

510 mM TCA

17 mM EDTA

3.8.2 Luciferáz-assay

Az eljárás alapelve, hogy a luciferáz oxigén jelenlétében és ATP felhasználásával a luciferin nevű fluoreszcens szubsztátot bontja, mely folyamatot fényemisszió kísér. A reakció szigorúan kvantitatív, és az emittált fény luminométerrel detektálható.

A kultúrákból extrahált nukleotidokból 3 fokozatú hígítást készítettem (800-, 1200-, 1600-szoros) pirogénmentes steril vízzel, majd mindegyik mintából 100 µl-t azonos volumenű luciferáz-reagenssel (Kit CLS) elegyítettem, majd megkevertem. 10 perc inkubáció után (szobahőmérsékleten) 10 másodperc hosszan mértem. A mérést Autolumat LB 953 Bertolt típusú luminométerrel végeztem. Mérési kontrollként levegőt, illetve a hígításhoz használt vizet tartalmazó csövet használtam. A kapott értékekből a víz-háttérrel levontam, majd az adatokat egységnyi hígításra vonatkoztatva átlagoltam. Ezután a mintákat 100 % kontrollra vonatkoztattam. Mindegyik mérést egyszer ismételtam, és csak azokat az értékeket fogadtam el, melyek $\pm 5\text{ }%$ hibahatáron belül egymással identikusak voltak. A levegő-kontrollokból a két mérés közt eltelt időben a reakció gyengülését figyelhettem meg. Ennek nem szabadott 20 %-ot túllépnie (máskülönben a luciferáz enzim és / vagy a luciferáz reagens nem volt megfelelő). Minden kísérletnél 2 kontrollt izoláltam, melyeknek $\pm 5\text{ }%$ -on belül egymással identikusnak kellett lenniük. A három párhuzamos hígításból legalább kettőnek a detektálás szempontjából lineáris

tartományba kellett esnie. Csak azokat az eredményeket fogadtam el, melyek a fenti követelmények mindegyikének eleget tettek. Meghatároztuk a módszerre jellemző standard devianciát, mely $\pm 5\%$ -nak adódott. Csak az ezen belüli értékek szerepelnek jelen értekezés „Eredmények” című részében. Minden mérést 5 – 9 esetben végeztem el. Abban az esetben, ha valamely adatpont értékeinek többsége a 9. mérés esetében sem esett a standard deviancia által megszabott határok közé, az adatpont jellemzése elmaradt.

3.9 A sejtek ATP- és GTP-pooljának együttes meghatározása: HPLC kísérletek

A HPLC-kísérletekhez oktadecil-szilán alapú ioncserés oszlopot használtam. Az oszloppal valamennyi purin-nukleotid elválasztható volt

A műszer alacsony nyomású rendszerrel dolgozott: az intelligens keverőkamrába csatlakozó pumpákon keresztül biztosítható volt a gradiens elúció. A keverőkamrából az eluáló szert egy alacsony nyomású pumpa juttatta az oszlopra. A műszer kb. 10 perc működés után állandó nyomást tartott fenn. Ekkor egy spirálon keresztül injektáltam a mintát a rendszerbe. Az elúció pH-gradienssel történt. Az oszlopot használaton kívül nagy tisztaságú metanollal töltöttem fel, mely a rendszer védelmét és sterilitását biztosította.

Rendszer

Merck/Hitachi

L4250 UV-vis detektor

L6200A intelligens pumpa

D2500 Kromatogramm-integrátor

Minta-hurok térfogata: 100 μ l

Oszlop

Típus: Supelcosil LC18T

Átmérő: 4,6 mm

Hossz: 150 mm

Pórusnagyság: 3 μ m

Eluens

125 mM KOH, szűrt

10 mM TBAH5, szűrt

3 g / l KOH, szűrt

60 ml / 1000 ml metanol

A (az Eredmények részben ismertetett) módszerfejlesztés során az előző rendszer helyett Gyncotek 480 pumpát használtam. A nukleotidok elválasztása Whatman Partisil PXS 10 / 25 SAX oszlopon 25 °C-on történt, 0,1 M pH 6,0 Na-foszfát izokratikus elúciójával. Az átfolyás 2.0 ml / perc volt. A minta-hurok térfogata 100 µl volt. A detektálás UV TSK 6040 detektorral történt 254 nm-en. Az adatokat Axxiom szoftverrel értékeltem ki. Az ATP és GTP méréseknél a standard deviancia $\pm 6 \%$ volt. A kísérleteket 5 –ször (MPS) illetve 9 –szer (2,4-DNP) végeztem el.

A sejtfeltárásokat (mivel a módszerfejlesztés részét képezték) az Eredmények részben ismertetem.

3.10 A sejtfelszíni hidrofilitás meghatározása

A sejtfelszíni hidrofilitás meghatározása a korábban leírt (Rosenberg et al., 1980) gyors, hexadekán-extrakciós módszerrel történt, az alábbi változtatásokkal: a sejteket azonnal megöltem -20 °C (az előzőekben ismertetett összetételű) killing-jégre való pipettálással. A sejteket lecentrifugáltam, majd jéghideg killing pufferben mostam, ezután 10 °C-os fiziológiás sóoldatban mostam, majd szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldatban reszuszpendáltam. A reszuszpendált oldat egy részét (kontrollként) azonnal 550 nm-en fotometráltam, a maradékból 3 ml baktérium-szuszpenziót adtam 3 ml hexadekánhoz. Az elegyet 15 másodpercig vortexeltem, ezt követően 25 ml-es bürettában 30 percen keresztül, 22 ± 1 °C-on hagytam a két fázist szétválni. Az alsó (vizes) fázisból kb. 2,5 ml-t engedtem le, és 550 nm-en fotometráltam. A kapott értéket elosztottam a kontroll értékkel, így megkaptam az abszolút hidrofilitást, melyet a kezeletlen kontroll hidrofilitására vonatkoztatva kiszámoltam a relatív hidrofilitást. Minden kísérletben 2 kontrollt vettem.

Valamennyi kísérletben csak akkor fogadtam el az eredményeket, ha a 2 kontroll $\pm 4 \%$ -on belül identikus volt egymással. A standard deviancia $\pm 4 \%$ volt. A kísérleteket 5 – 9-szer végeztem el.

3.11 A talaj-részecskékhez való kitapadási képesség meghatározása

A baktériumokat 25 ml LB tápoldatban növesztettem, mely 1,5 g cellulóz port és 1,5 g mosott folyami homokot tartalmazott. A sejtszámot az 550 nm hullámhosszon mért optikai denzitásból határoztam meg, miután a szilárd hordozót szűrővel eltávolítottam. Mérési kontrollként a NaCl (illetve a kezeletlen kontroll esetében azonos mennyiségű tápoldat) hozzáadása előtti időpillanatban vett minta optikai denzitása szerepelt. A 30 perces minták optikai denzitását a mérési kontrolléra vonatkoztattam, és annak %-ában fejeztem ki. A standard deviancia $\pm 6\%$ volt. A kísérletet 9-szer végeztem el.

4 Eredmények

4.1 A *Bacillus subtilis* σ^B aktiválásához vezető szignál-transzdukciós út

Az ebben a fejezetben található növekedési görbék közül azokon, melyeken egy nyíl található a nyíl a gátlószer alkalmazásának időpontját, míg a nukleozid kiegyenlítéses ábrákon az első nyíl a nukleozid kezelés, míg a második nyíl a gátlószernek tenyészetbe adásának időpontját jelzi. A táblázatokban a „Minta megnevezése” oszlopban a számok a stressz behatásának időpillanata óta eltelt időt jelentik percben. Ahol másképpen nem jelöljük, a táblázatokban és az ábrákon a „relatív” szó a kezeletlen kontrollhoz való viszonyítást jelenti. Az ábrákon a hibasávok a standard hibát mutatják.

Amint azt már a bevezető részben említettük, lényegesnek tartottuk megismerni, hogy milyen belső jel átalakítási mechanizmusok vezetnek a σ^B –függő stressz-fehérjék génjeinek expressziójának indukálásához. Ezek közül kerestük a „közvetlen” jelemolekulát, amely hiányában az RsbW nem disszociál le a σ^B -ről. A bevezető részben említettük, hogy a σ^F aktivitását szabályozó fehérje-rendszer felépítése a σ^B -t szabályozó downstream-modulhoz hasonló. Mivel a σ^F –függő gének expresszióját elsődlegesen az intracelluláris ATP-koncentrációban bekövetkező drop indukálja, logikus volt feltételezni, hogy ez hatással lehet a σ^B –függő gének indukációjára is, illetve nem zárható ki, hogy esetleg az ATP-drop legyen a közvetlen szignál. Munkánk során először ennek a hipotézisnek a helyességét vizsgáltuk meg.

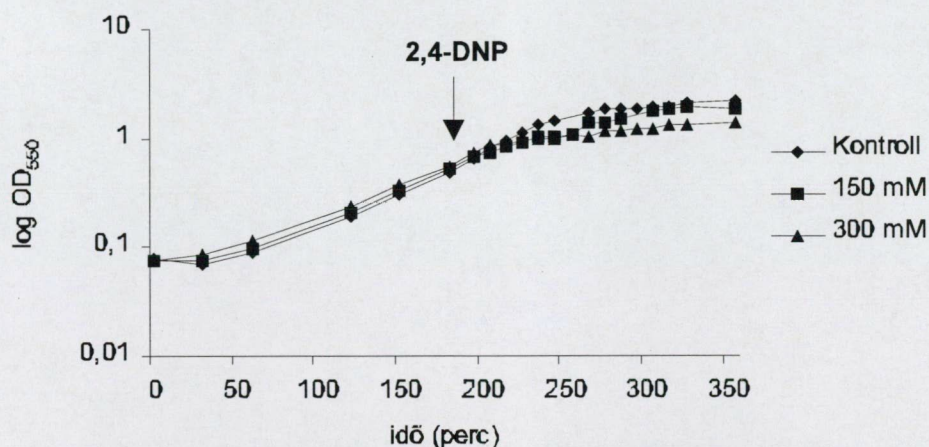
4.1.1 Az ATP-drop jel szerepe a σ^B -függő gének indukciójában

4.1.1.1 Szétkapcsoló szer alkalmazása

A kísérletekhez olyan 2,4-dinitrofenol-koncentrációt használtunk, melyet a sejtek még túlélnek, de növekedési görbéjüket már (negatívan) befolyásolja, tehát hatékonyan csökkenti az ATP-poolt. Mint az **5. ábrán** látható, a 150 μ M-os koncentráció megfelelt ezen követelményeknek, ezenkívül (mivel a 2,4-DNP-t etanolban oldottuk) fele mennyiségű etanol került a kultúrába, mint az azonos törzsoldatból készített 300 μ M végkoncentrációjú 2,4-DNP kísérlet esetén, így az oldószer kevésbé befolyásolta a kísérleteket.

5. ábra

A 2,4-DNP hatása a *B. subtilis* növekedésére



A 2,4-dinitrofenol a *sigB* és *gsiB* gének hatékony induktorának bizonyult (**1. táblázat**) és monofázisos, gyors (3 perces maximummal) indukciót okozott. Az adatok grafikus ábrázolása a **6. és a 7. ábrán** látható. Az oldószerkontrollal (0,15 % etanol) nem sikerült sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* esetében megnövekedett génexpressziót kimutatnunk.

A fenti eredményeket az EMAU (Greifswald, Németország), Institut für Mikro- und Molekularbiologie rendelkezésére bocsátottuk, ezek részben közlésre kerültek (Maul et al., 1995).

Az mRNS-analízishez a mintavételkor Luciferáz assay-hez is történt mintavétel. A 2,4-DNP esetben a Luciferáz assay-t Björn Maul végezte. Mérései igazolták, hogy a 2,4-DNP stressz alkalmazása után 3 perccel a sejtek ATP koncentrációja 85 % -a a kezeletlen kontrollénak (Maul et al., 1995).

1. táblázat

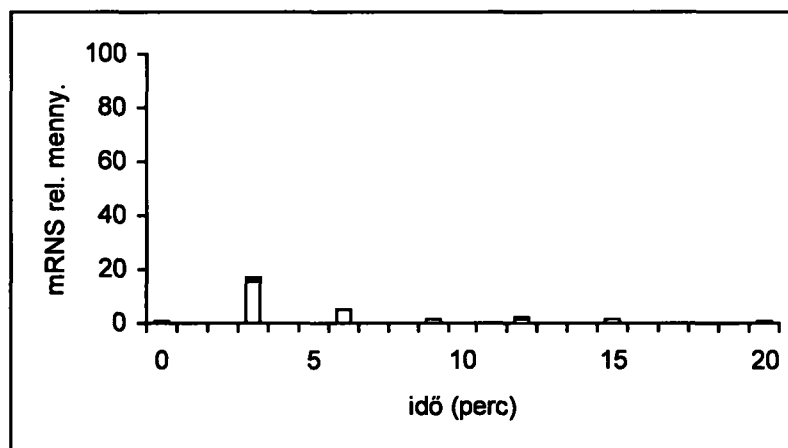
A 2,4-DNP hatása a sigB és gsiB génekről átíródott mRNS mennyiségére

MINTA	RELATÍV mRNS MENNYISÉG	
	sigB	gsiB
kontroll	1,0	1,0
3 min.	16,1	90,6
6 min.	5,3	87,2
9 min.	1,3	67,0
12 min.	1,8	54,7
15 min.	1,4	22,9
20 min.	0,6	1,1

A kísérletekben az IS58 törzset használtuk.

6. ábra

A sigB-mRNS relatív mennyisége 2,4-DNP kezelés után



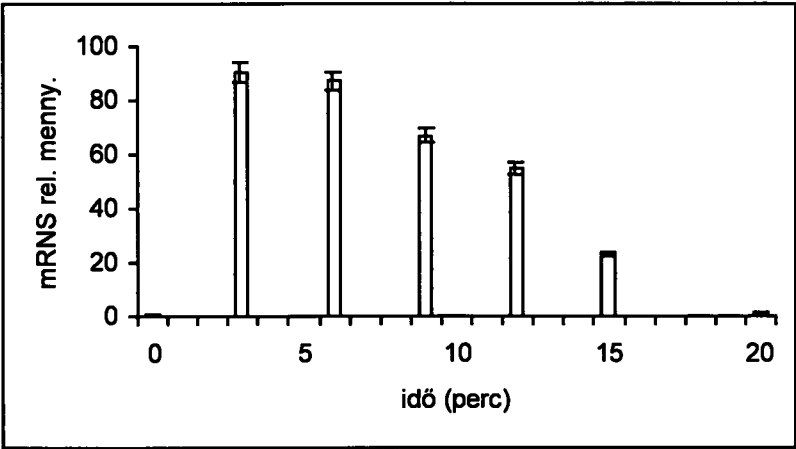
4.1.2 A GTP-drop jel szerepe a σ^B -függő gének indukciójában

Mivel a GMP bioszintézisében szerepet játszó guanilsav-szintetáz enzim működéséhez ATP-t igényel nem volt kizárható, hogy esetleg az ATP-drop hatására bekövetkező GTP-drop indukáló hatását észleltük a 2,4-DNP kísérletek során. Ezt a hatást az alább ismertetendő kísérletsorozattal igyekeztünk mérni. A GTP-pool csökkentésére irányuló

kísérleteknél hangsúlyoznunk kell, hogy elsődleges célunk a GTP-drop által okozott indukció kizárása vagy valószínűsítése volt.

7. ábra

A *gsiB*-mRNS relatív mennyisége 2,4-DNP kezelés után



4.1.2.1 Mikofenolsav (MPS) - kezelés

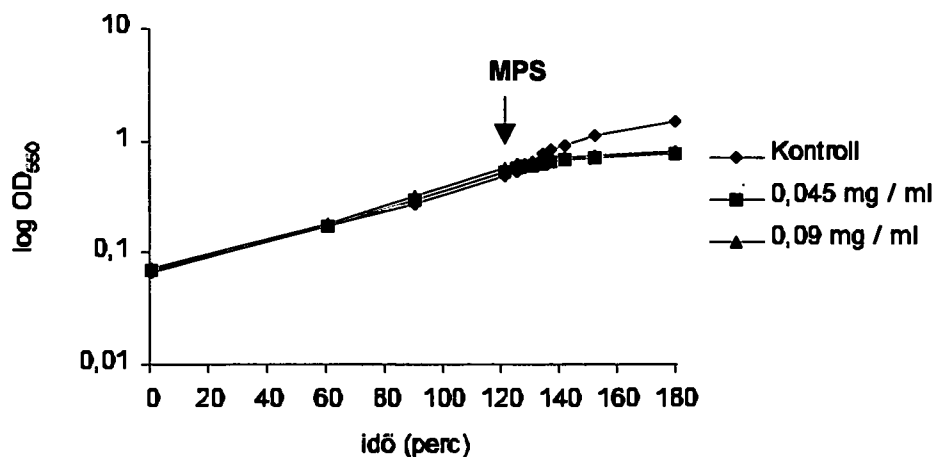
A mikofenolsav egy antibiotikum, mely csökkenti a GMP, GDP és GTP sejtbeli koncentrációját (Wu and Scrimgeaur, 1973).

A mikofenolsav hatását a szakirodalomból származó adatok szerint két különböző koncentráció-értéknél vizsgáltuk, és a 8. ábra alapján a kisebb koncentráció-értéket (0,045 µg / ml) választottuk a további kísérletekhez, ilyen módon csökkentve az oldószerként használt etanol befolyását.

A kísérleteket (a σ^F -kísérletekkel való összehasonlíthatóság miatt) az IS58 törzzsel végeztük el. Az eredményeket a 2. sz. táblázat tartalmazza. A mért indukciós adatok szerint a *sigB* és a *gsiB* rendkívül kismértékű (a szignifikancia határait súroló), többfázisos indukciós profilt mutatott. A mérési eredmények szórása némely időpontban olyan nagy volt, hogy (figyelembe véve a standard devianciára vonatkozó kritériumot) lehetetlen volt megbízható adattal szolgálni. Minden ilyen esetben a „nincs adat” kifejezés szerepel a táblázatban. A 18 és 25 perces (egyébként szokatlan) mintavételi időpontok is a nagyfokú szórás miatt kerültek a kísérletbe bevonásra.

8. ábra

Növekedés mikofenolsavval



2. táblázat

A *sigB* és *gsiB* mRNS mennyisége MPS-kezelés után

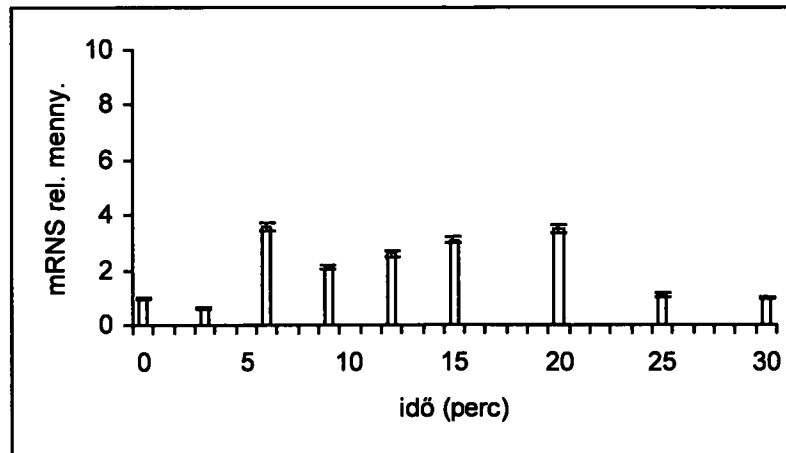
MINTA	RELATÍV mRNS MENNYISÉG	
	<i>sigB</i>	<i>gsiB</i>
kontroll	1,0	1,0
3 min.	0,6	5,2
6 min.	3,6	4,3
9 min.	2,1	3,3
12 min.	2,6	nincs adat
15 min.	3,1	6,1
18 min.	nincs adat	7,6
20 min.	3,5	2,9
25 min.	1,1	4,3
30 min.	1,0	nincs adat

Az eredmények grafikus ábrázolása a 9. ábrán (*sigB*) és a 10. ábrán (*gsiB*) található.

Az mRNS-analízishez a mintavételkor Luciferáz assay-hez is történt mintavétel. Az MPS esetben a Luciferáz assay-t Björn Maul végezte. Mérései szerint a sejtek ATP-koncentrációja a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva 55 %-ra csökkent a kezelést követő 20. percben. A csökkenés az AMP bioszintézisben résztvevő adenilo-szukcinát szintetáz (mely aktivitásához GTP-t igényel) indirekt gátlásával magyarázható.

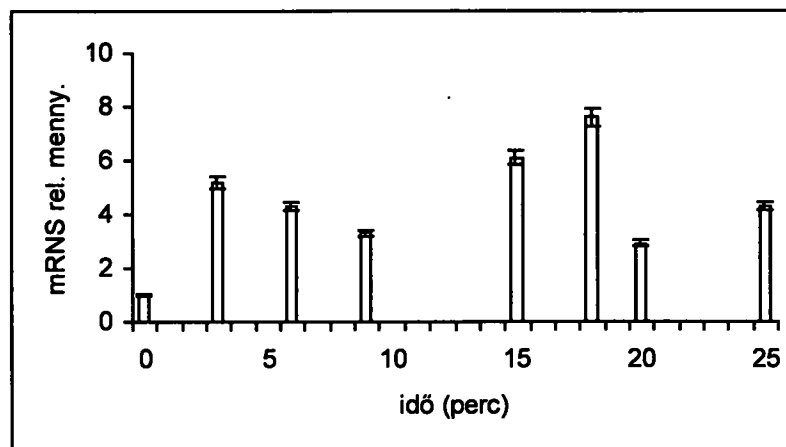
9. ábra

A sigB mRNS relatív mennyisége MPS-kezelés után



10. ábra

A gsiB mRNS relatív mennyisége MPS kezelés után

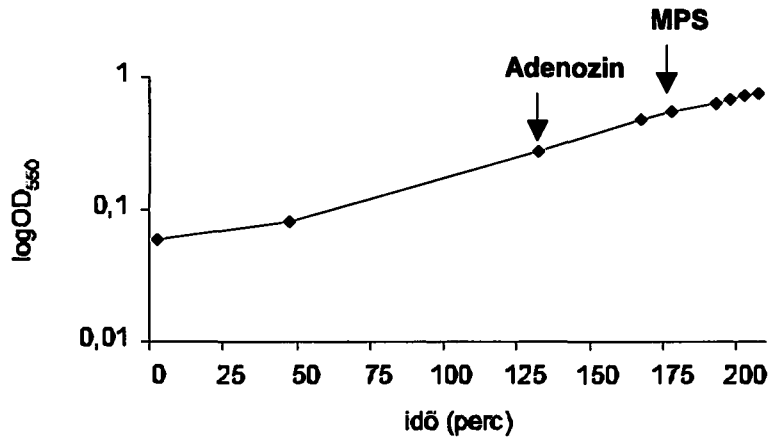


4.1.2.2 Nukleozid-kiegénylési kísérletek

Az adenzint a *Bacillus subtilis* felvétel után képes AMP-n keresztül –megfelelő mennyiségű rendelkezésre álló energia esetén– ATP-vé alakítani. A kísérlet során alkalmazott mikofenolsav koncentráció megegyezett az előzőekben alkalmazottal (0,045 µg / ml). Az adenzint 1,2 mM-os végkoncentrációban (számításaink szerint bő feleslegben) alkalmaztuk. Mint a 11. ábrán látható, az MPS jelen esetben nem befolyásolta a baktérium-kultúra növekedését. Szignifikáns expressziót sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* esetében nem tapasztaltunk. A kísérleteket az IS58-as törzzsel végeztük.

11. ábra

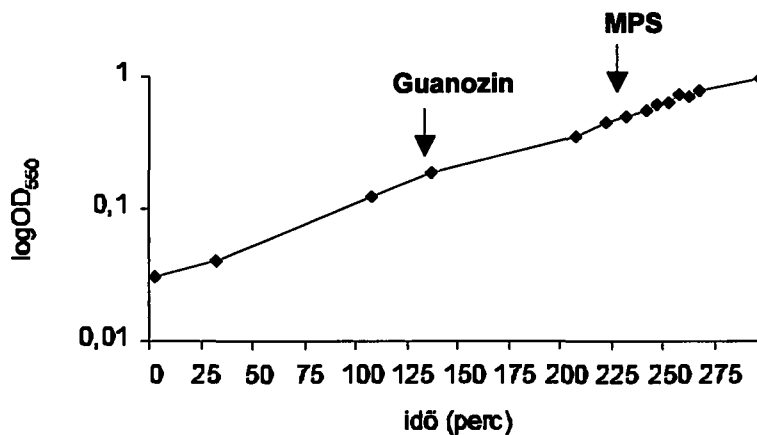
Növekedés adenozin + MPS-kezelés után



A *Bacillus subtilis* a felvett guanozint GMP-n keresztül GTP-vé képes alakítani. A kísérletekben alkalmazott MPS koncentrációja (az előzőekkel egyezően) $0,045 \mu\text{g} / \text{ml}$ volt. A guanozint (az adenozinnal egyezően) $1,2 \text{ mM}$ -os koncentrációban alkalmaztuk. Mint a növekedési görbén látszik (12. ábra) a kísérlet során nem jött létre (az MPS hatására jellemző) stacionáris fázis. A guanozinnal ellensúlyozott MPS hatás után nem mutatható ki a *sigB* és a *gsiB* mRNS-einek mennyiségében szignifikáns változás a kontrollhoz képest. A kísérleteket az IS58-as törzzsel végeztük.

12. ábra

Növekedés MPS+guanozin-kezelés után

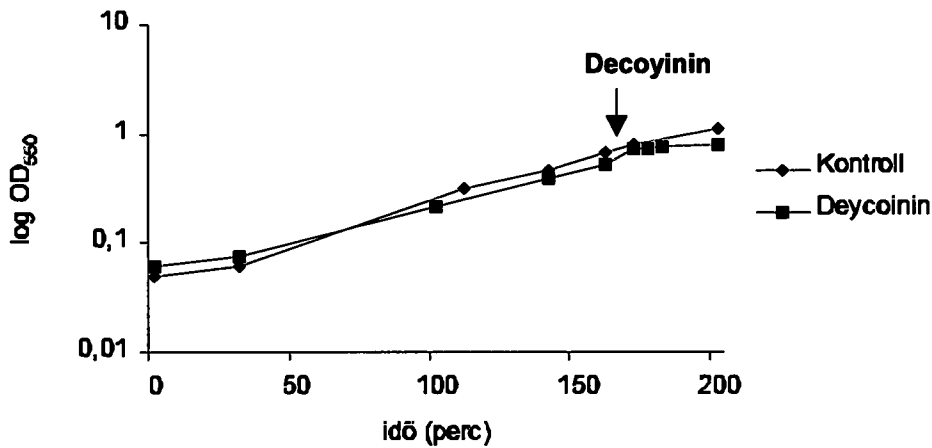


4.1.2.3 Decoyinin-kezelés

Mivel a mikofenolsavas kísérletek nem szolgáltak egyértelmű válasszal arra a kérdésre, hogy a GTP-pool csökkentése a σ^B -regulon aktiválásához vezet-e, szükségesnek láttuk egy újabb gátlószer, a decoyinin alkalmazását. A decoyinin a GMP-szintetáz gátlása révén a sejtbeli GMP, GDP és GTP koncentrációt csökkenti. A gátlószert 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ végkoncentrációban alkalmaztuk, KOH-ban oldva. A 13. ábrán látható növekedési görbe szerint a baktérium a kezelést követően stacionális fázisba lépett.

13. ábra

Növekedés decoyinin-kezelés után



A kezelés eredményeképpen a *gsiB* mRNS relatív mennyisége közepesen megnő, míg a *sigB* mRNS indukciója igen alacsony fokú (3. táblázat).

3. táblázat

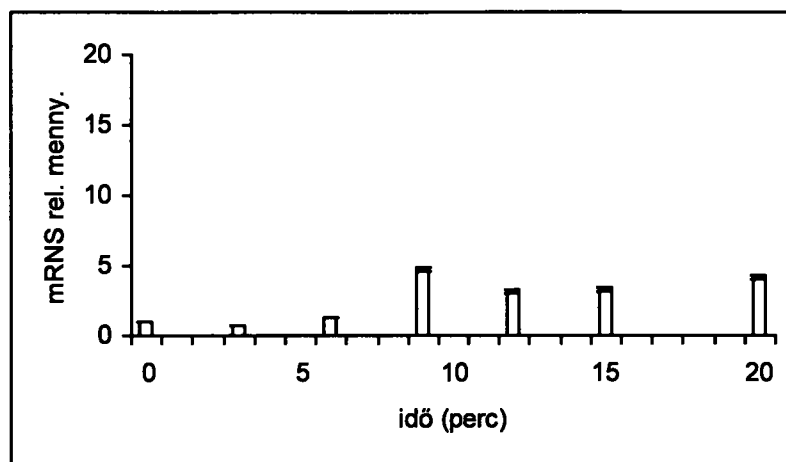
A *sigB* és *gsiB* mRNS mennyisége decoyinin-kezelés után

MINTA	RELATÍV mRNS MENNYISÉG	
	sigB	gsiB
kontroll	1,0	1,0
3 min.	0,7	3,0
6 min.	1,3	6,1
9 min.	4,7	14,7
12 min.	3,1	13,3
15 min.	3,3	13,1
20 min.	4,1	15,7

Az eredmények grafikus ábrázolása a 14. ábrán (*sigB*) és a 15. ábrán (*gsiB*) található.

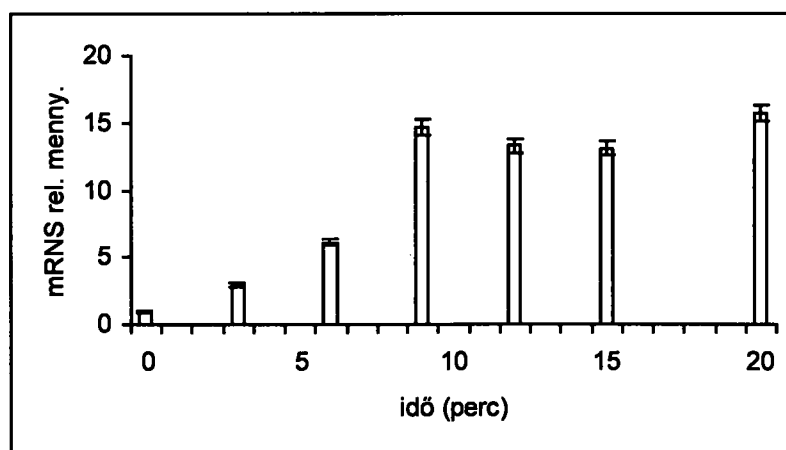
14. ábra

A sigB mRNS relatív mennyisége decoyinin-kezelés után



15. ábra

A gsiB mRNS relatív mennyisége decoyinin-kezelés után



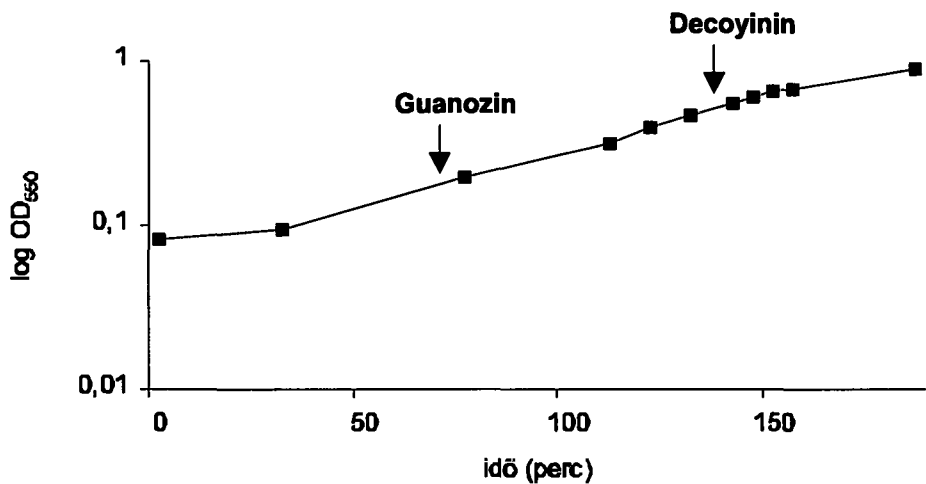
4.1.2.4 Decoyinin-kezelés guanozin kiegyenlítéssel

A következő kísérletekben a decoyint az előzőekben alkalmazott végkoncentrációban (1 μg / μl) mértük be. A guanozint 1,2 mM-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A kezelést követően a decoyininre jellemző stacionális fázisba lépést nem lehetett megfigyelni (16. ábra).

A *sigB* gén nem indukálódott. A *gsiB* gén a legtöbb időpontban vett minta esetében szintén nem indukálódott, viszont megjegyzendő, hogy a 20 perces mintánál rendkívül alacsony (5,9-szeres) indukció volt mérhető.

16. ábra

Növekedés guanozinnal ellensúlyozott decoyinin-kezelés után



4.1.2.5 2,4-dinitrofenol kezelés guanozin kiegyenlítéssel

A 2,4-DNP-t az előzőekben alkalmazott 150 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk. A guanozin koncentrációja megegyezett az előzőekben alkalmazott 1,2 mM-os koncentrációval. Bár a 2,4-dinitrofenol az exponenciális fázisú baktérium növekedését nem befolyásolta, a kezelés erősen megnövekedett *sigB* és közepesen erősen megnövekedett *gsiB* mRNS mennyiséghez vezetett a kontrollhoz viszonyítva (4. táblázat). A kísérleteket az IS58 törzzsel végeztük el. Az eredmények grafikus ábrázolása (a 6. illetve a 7. ábrán alkalmazott skálával megegyező skálán) a 17. (*sigB*) és a 18. (*gsiB*) ábrán látható.

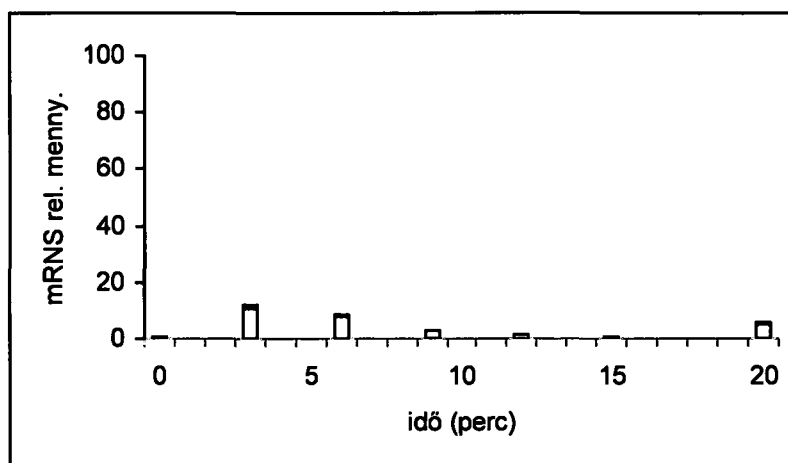
4. táblázat

A *sigB* és *gsiB* mRNS relatív mennyisége 2,4-DNP + guanozin- kezelés után

MINTA	mRNS RELATÍV MENNYISÉGE	
	sigB	gsiB
kontroll	1,0	1,0
3 min.	11,3	4,1
6 min.	8,3	18,9
9 min.	3,0	16,0
12 min.	1,6	4,9
15 min.	1,0	2,2
20 min.	5,3	2,5

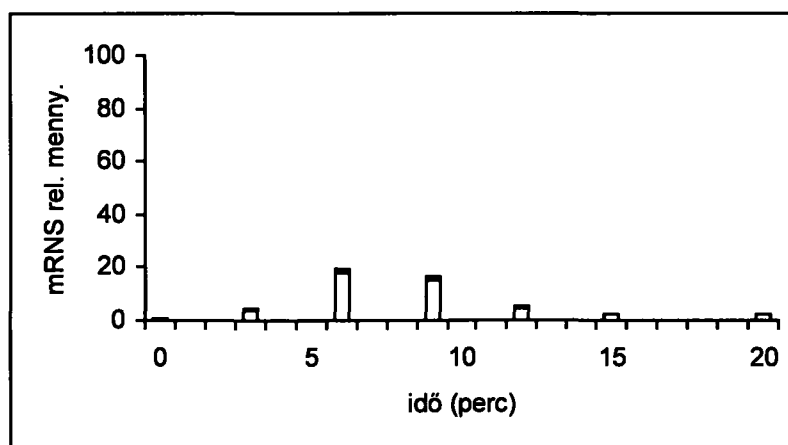
17. ábra

A sigB mRNS relatív mennyisége 2,4-DNP + guanozin-kezelés után



18. ábra

A gsiB mRNS relatív mennyisége 2,4-DNP + guanozin-kezelés után

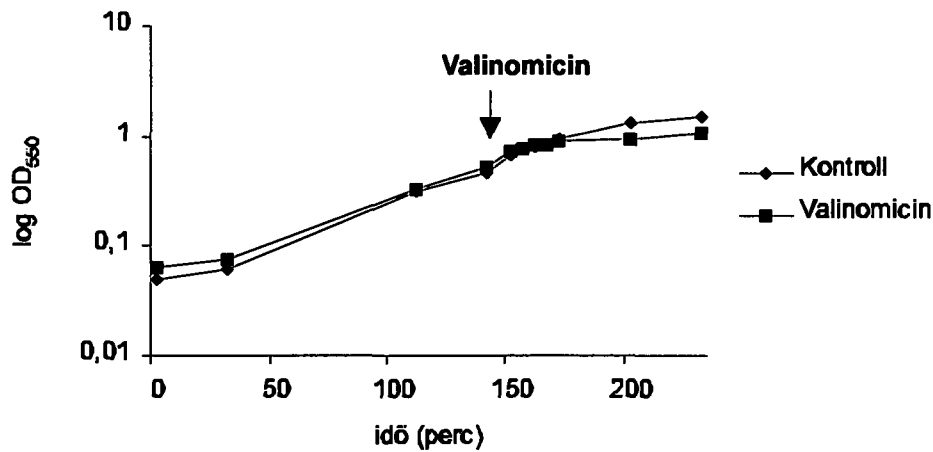


4.1.3 Ionofor- (kivéve protonofor) kísérletek

A valinomycin ionofor, mely K^+ ionokat szállít a sejt környezetéből a sejtbe. A kísérletek során használt valinomycin koncentrációját, a szakirodalomból származó adatok alapján, B. Maul módosította, és köszönettel rendelkezésünkre bocsátotta (14,4 μ M végkoncentráció, acetonban oldva). A kísérleteket az IS58 törzzsel végeztük el. A kezelést követően az exponenciális fázisú sejtek növekedése jelentősen lelassult, majd a sejtek stacionális fázisba léptek (19. ábra).

19. ábra

Növekedés valinomycin-kezelés után



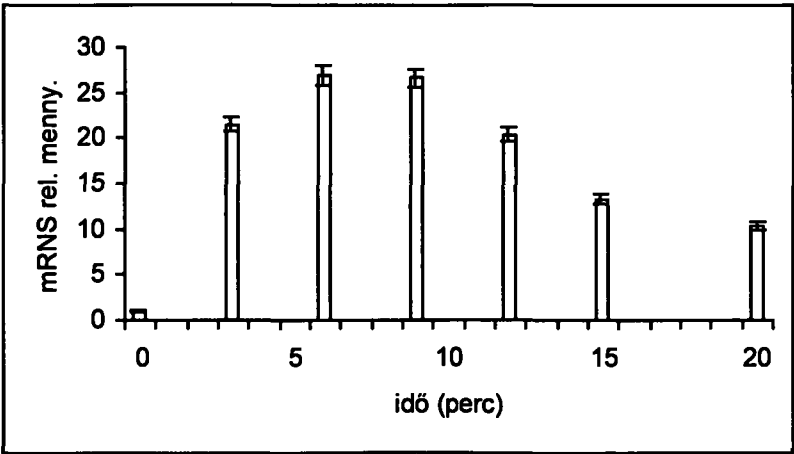
5. táblázat

A *sigB* mRNS relatív mennyisége valinomycin-kezelés után

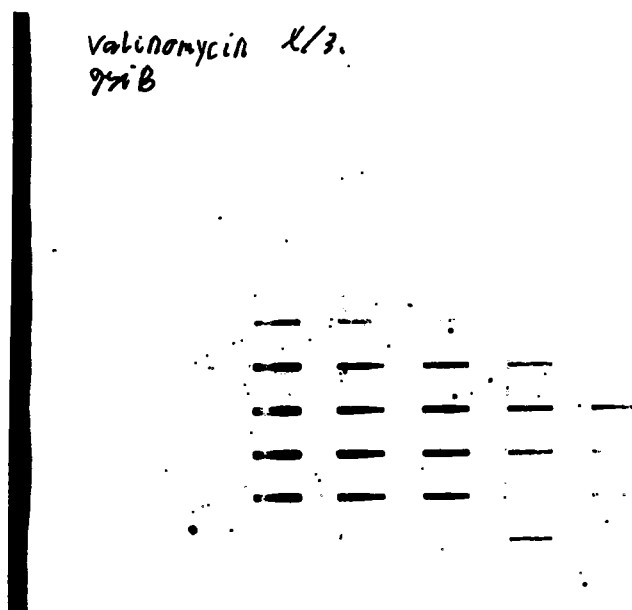
MINTA	<i>sigB</i> mRNS
kontroll	1,0
3 min.	21,5
6 min.	26,9
9 min.	26,6
12 min.	20,4
15 min.	13,3
20 min.	10,4

20. ábra

A *sigB* mRNS relatív mennyisége valinomycin-kezelés után



Tipikus slot-blot eredmény: a *gsiB* gén indukciója valinomycin-kezelést követően



A *sigB* (5. táblázat) és *gsiB* (21. ábra) gének indukciója rendkívül erős volt. Az eredmények grafikus ábrázolása a 20. (*sigB*) ábrán látható. Sajnálatos módon, a nagyon gyenge kontroll-értékek miatt pontos *gsiB* adatokkal nem tudunk szolgálni, de a 21. ábra tanúsága szerint az mRNS relatív mennyiségének a növekedése több mint 100-szoros (a kontroll hibridizációs csíkja a kevés *gsiB* mRNS-tartalma miatt a 21. ábrán nem látható).

4.1.4 Puromicin - kísérletek

Az *E. coli* hősokk-válasza esetén ismert, hogy konformáció-károsodott fehérjék is indukálhatnak stresszválaszt (Bukau, 1993). Mivel az ATP szükséges a natív konformáció fenntartásához, illetve a GTP a transzlációhoz, és mindkét nukleotid pooljának a csökkentése a σ^B regulon indukciójához vezetett, szükségesnek tartottuk az un- és misfolded fehérjéknek a σ^B regulonra gyakorolt hatását vizsgálni.

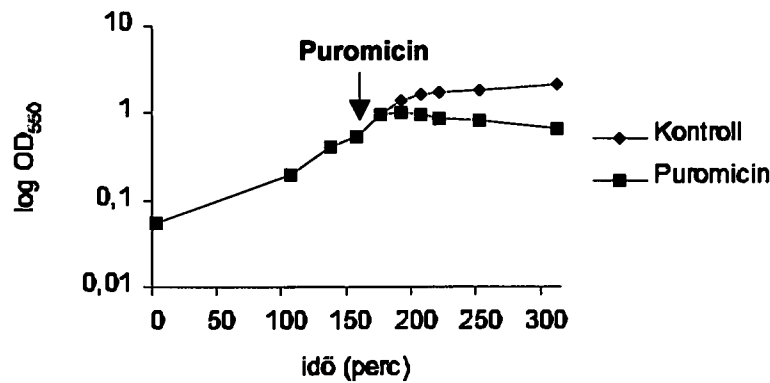
A kísérletekhez a puromicin nevű antibiotikumot használtuk, mely alkalmas az un- és misfolded fehérjék mennyiségének megnövelésére,

A puromicin-kezelés eredményeképpen az exponenciális növekedésű sejtek azonnal stacionális fázisba léptek, sőt számuk a kezelést követő 30. perc után drasztikusan elkezdett

csökkenni (22. ábra). A kezelést követően a *sigB* közepesen, a *gsiB* pedig erősen indukálódott (6. táblázat).

22. ábra

A baktériumok növekedése puromicin-stressz alatt



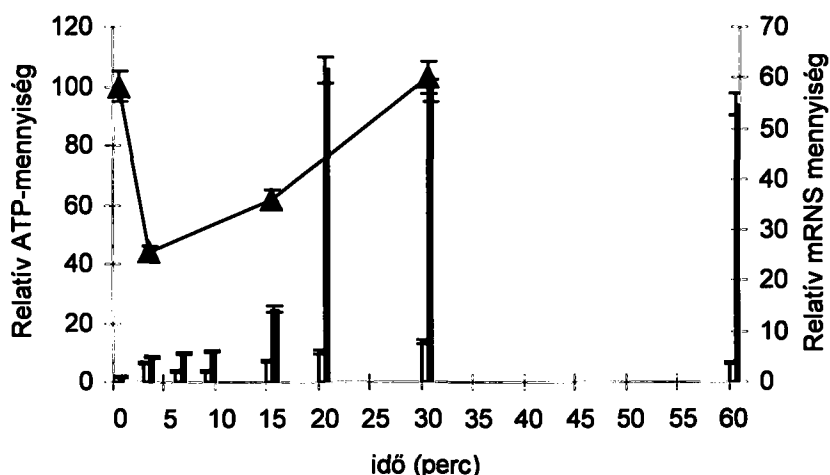
Mivel a kezelést követően az energia-szolgáltatáshoz szükséges enzimek is károsodhattak, fontos volt az ATP-poolra gyakorolt hatás vizsgálata is. A kezelést követően a sejt ATP-poolja drasztikusan lecsökkent (6. táblázat). Az eredmények grafikus ábrázolása a 23. ábrán látható. A kísérleteket az IS58-as törzzsel végeztük el.

6. táblázat

A *sigB* és *gsiB* mRNS, illetve az ATP relatív mennyisége puromicin-kezelés után

MINTA	AZ mRNS RELATÍV MENNYISÉGE		RELATÍV ATP MENNYISÉG (%)
	sigB	gsiB	
Kontroll	1,0	1,0	100
3 min.	3,7	5,0	44
6 min.	2,2	5,8	n.a.
9 min.	2,1	6,1	n.a.
15 min.	4,0	14,3	62
20 min.	5,9	21,5	n.a.
30 min.	7,8	57,6	103
60 min.	3,9	54,7	n.a.

A *sigB* és *gsiB* mRNS és az ATP rel. mennyisége puromicin-kezelés után



Az ábrán a teli vonal a *gsiB*, míg az üres vonal a *sigB* mRNS relatív mennyiségét jelöli. Háromszöggel az ATP relatív mennyiségét jelöltük.

4.1.5 A σ^B -regulon savstresszben játszott szerepe

Mivel a 2,4-DNP kezelést követően tapasztalt erős indukcióhoz az intracelluláris savasodás is hozzájárulhatott, ezért szükségesnek tartottuk az alább leírt kísérletek elvégzését.

4.1.5.1 A savstressz hatása a baktériumok növekedésére

A növekedési görbék felvételénél a pH = 7,5 – 6,5 tartományban MOPS-pufferolt, a pH = 6,0 és ennél savasabb értékeknél Na₃citrát/citromsav pufferolt minimálmédiumot használtunk. A kétféle puffer növekedésre gyakorolt hatását pH = 6,5 értéknél vizsgáltuk, és szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk.

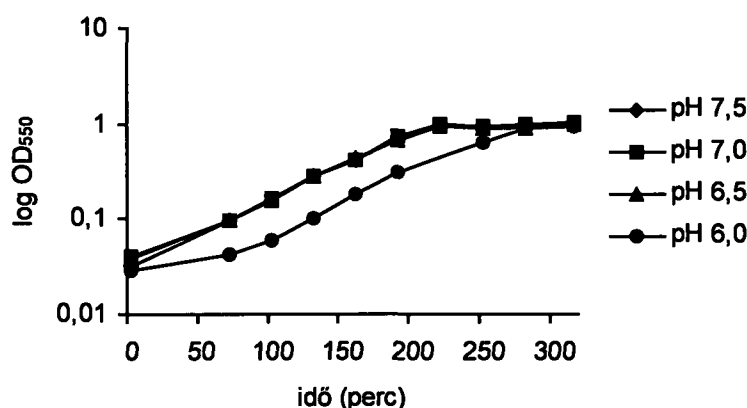
A növekedési görbék a 24. ábrán (pH = 7,5 – 6,0) illetve a 25. ábrán (pH = 5,5 – 4,0) láthatók. Ezekhez a kísérletekhez az IS58-as törzset használtuk, mivel egyben meghatároztuk azt a pH-értéket, ahol a transzkripció-analízist érdemes elvégezni.

Mint a 24. ábrán és 25. ábrán látható, a *B. subtilis* növekedése pH = 6,0 értéken már szignifikánsan lassabb, mint a számára optimális pH = 7,5-en. pH = 4,5-en és ez alatt a baktérium nem képes növekedni. Hasonló eredményeket kaptunk a *B. subtilis* 168-as

törzsével is, azzal a különbséggel, hogy ez a törzs pH = 4,5-en még nagyon lassan, de növekedett.

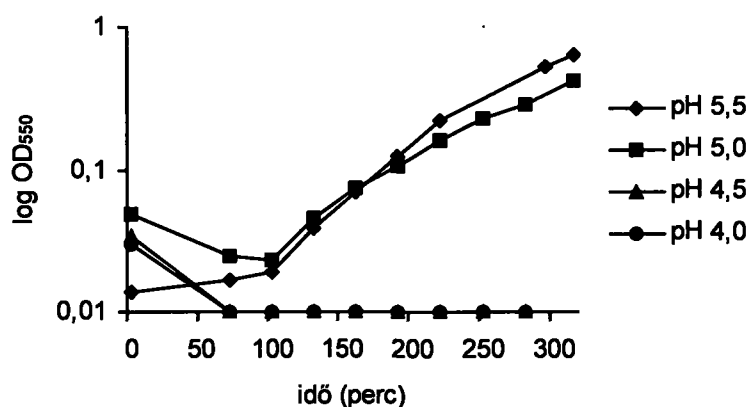
24. ábra

A Bacillus subtilis növekedése 7,5 – 6,0 pH tartományban



25. ábra

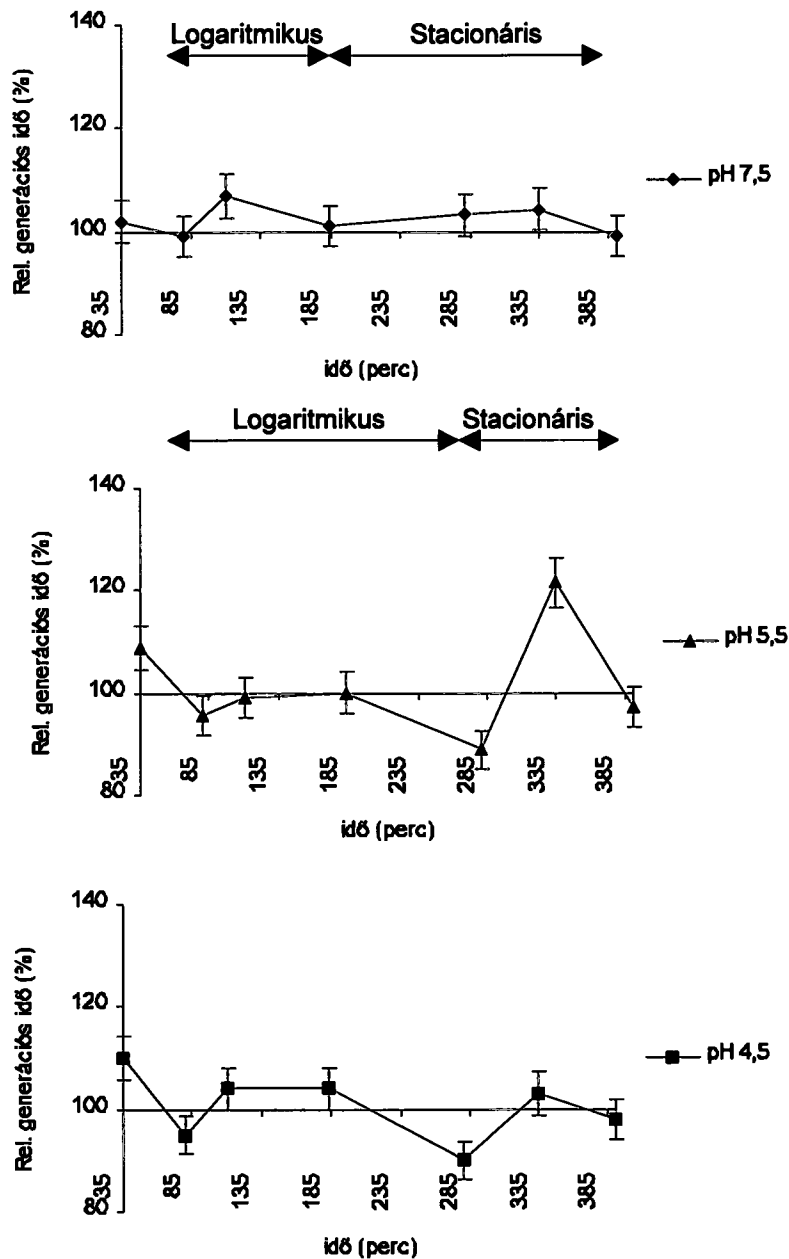
A Bacillus subtilis növekedése 5,5 – 4,0 pH tartományban



A következőkben a vad típusú 168-as és a *sigB* deléciós ML6 törzs generációs idejét hasonlítottuk össze a pH = 7,5 – 4,5 tartományban (26. ábra). Az ábrán a generációs időket a ML6-os törzs adott pontnál mért generációs idejének az adott pontnál mért 168-as törzs generációs idejéhez viszonyítottuk, és az adott törzs generációs idejét ennek a viszonyzámnak a %-ában fejeztük ki. Így tehát a 100 % vonal alatti értékeknél az ML6 törzs, míg a vonal feletti értékeknél a 168-as törzs rendelkezett rövidebb generációs idővel, tehát gyorsabb növekedéssel. 100 % értéknél a két törzs generációs ideje azonos volt.

26. ábra

A *Bacillus subtilis* 168 és ML6 törzsek relatív generációs ideje savstressz esetén



Az ábrán csak a pH = 7,5; 5,5 és 4,5 értékeket ábrázoltuk. Az ábrák fölötti nyíl jelöli a logaritmus és stacionális fázisokat. A pH = 4,5 értéken a rendkívül hosszú generációs idő miatt a két fázist nem lehetett elkülöníteni. pH 5,5 értéknél a 168-as törzs gyorsabban adaptálódott a savas pH-hoz a logaritmus növekedés előtt. A korai stacionális fázisban pH 5,5-nél a 168-as törzs gyorsabban nőtt. Érdekes módon a késői logaritmus fázisban a mutáns ML6 rendelkezett rövidebb generációs idővel. A pH 5,5-nél a korai stacionális fázisban mért, a σ^B jelenlétének tulajdonítható protektív hatáshoz hasonlót tapasztaltunk pH

6,0 és pH 5,0 értékeknél is. A 7,5 és 4,5 pH-értékeken való növekedésben nem tapasztaltunk a két törzs között szignifikáns eltéréseket, kivéve, hogy a pH = 4,5 értéknél a logaritmikus fázis előtt a 168-as törzs jóval rövidebb generációs idővel rendelkezett. A kísérleteket 9-szer végeztük el. A standard deviancia mértékét a hibasávok jelzik.

4.1.5.2 Az extracelluláris pH csökkentésének hatása a σ^B -függő génexpresszióra

Ahhoz azonban, hogy biztonsággal állíthassuk, hogy a fenti védettséget nyújtó hatás a σ^B regulonnak volt köszönhető, szükségesnek láttuk a regulon savstressz alatti transzkripció-analízisének elvégzését. A transzkripció-analízishez az első olyan pH-értéket választottuk, amelynél az optimális pH = 7,5 értéken mért növekedéshez képest szignifikáns eltérés tapasztalható. Ez a pH = 6,0 volt. A kísérletekben bipufferolt médiumot használtunk, és (az anyagok, módszerek részben leírtak szerint) a mid-logaritmikus fázisú baktériumok táptalaját HCl-al pH = 6,0 ± 0,05 értékre titráltuk. A kísérlet eredményét a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat

A *sigB* és *gsiB* mRNS relatív mennyisége savstressz után

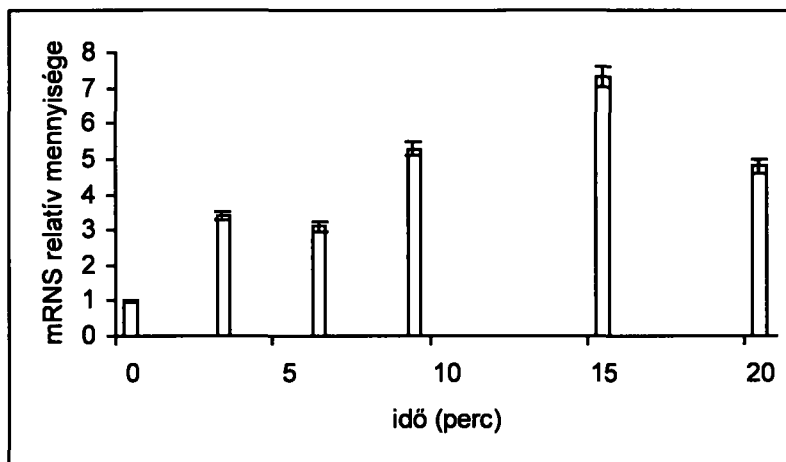
MINTA	AZ mRNS RELATÍV MENNYISÉGE	
	<i>sigB</i>	<i>gsiB</i>
Kontroll	1,0	1,0
3 min.	3,4	1,9
6 min.	3,1	3,0
9 min.	5,3	19,9
15 min.	7,3	51,2
20 min.	4,8	44,7

Az eredmények grafikus ábrázolása a 27. ábrán (*sigB*) és a 28. ábrán (*gsiB*) látható.

Mint az eredményekből látható, a *sigB* közepesen, míg a *gsiB* igen erősen indukálódott sav-stressz hatására.

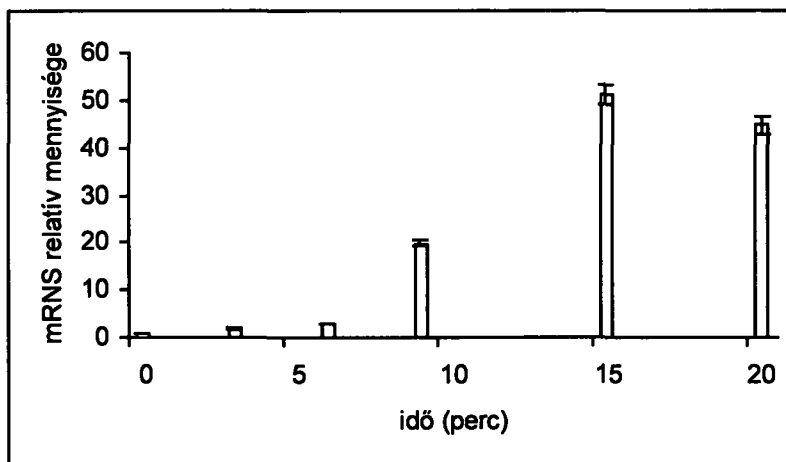
27. ábra

A sigB gén indukciója savstressz után



28. ábra

A gsiB gén indukciója savstressz után



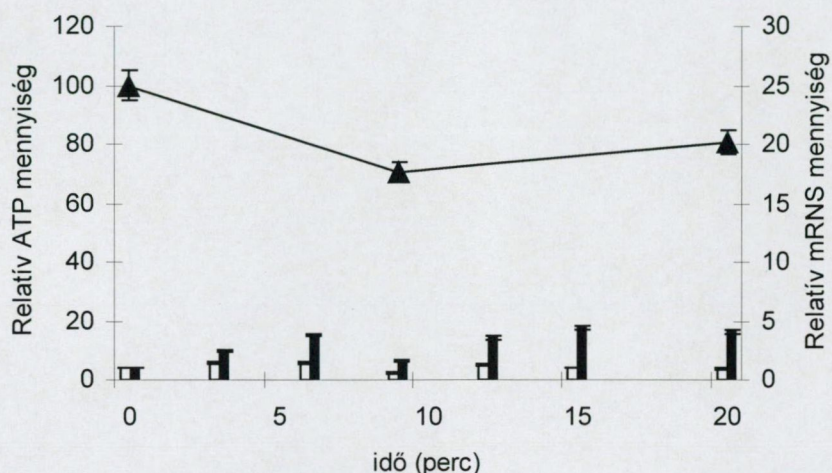
4.1.6 A lúgstressz hatása a σ^B regulon génjeinek expressziójára

Stresszorként 0,8 % (v/v) KOH-ot alkalmaztunk (az anyagok, módszerek részben leírtaknak megfelelően). Sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* esetében nem sikerült szignifikáns indukciót kimutatnunk (a *sigB* esetén 1,5-szörös illetve a *gsiB*-nél 4,4-szeres maximum nem számít szignifikáns indukciónak, összehasonlítva más stresszekével. Az eredmények grafikus ábrázolása a 29. ábrán látható.

Mivel a KOH az extracelluláris pH lúgosítása révén a PMF-et gyengíti, szükséges volt a KOH ATP-poolra gyakorolt hatásának mérése. A kísérlet során a KOH alkalmazását követően az ATP-pool értéke 9 perccel a stressz után $70,5 \pm 5 \%$ volt, ami a 20. percre kismértékű recovery-t mutatott ($80,6 \pm 5 \%$). Az eredmények grafikus ábrázolása a **29. ábrán** látható.

29. ábra

A sigB és gsiB gének expressziójának és a sejt ATP-pooljának alakulása KOH-kezelés után



Az ábrán a teli oszlopok a *gsiB*, az üres oszlopok pedig a *sigB* mRNS relatív mennyiségét jelölik. Az ATP-pool alakulását háromszögekkel jelöltük. A kísérlet során az IS58 törzset használtuk.

Megjegyzendő, hogy oldószerkontrollként elvégeztük a 0,4 % (v/v) KOH-os előadaptáció utáni 0,8 % (v/v) KOH-stresszt, és szignifikáns indukciót ekkor sem tapasztaltunk.

4.1.7 Oldószerek-kontrollok

4.1.7.1 Etanol kísérletek

A 0,15 % (v/v) végkoncentrációban bemért etanol nem indukálta sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* gént. A 0,235 % (v/v) végkoncentrációban bemért etanol a növekedést nem befolyásolta, a *sigB* gént nem, a *gsiB* gént viszont alacsony szinten indukálta (**8. táblázat**). A kísérleteket az IS58 törzsszel végeztük el.

Tekintettel arra, hogy ezek az eredmények nem befolyásolták közvetlenül munkánk célkitűzéseit (csupán oldószer-kontrollként szerepeltek), grafikus ábrázolásuktól eltekintünk. A kísérletekben az IS58 törzset használtuk.

8. táblázat

0,235 % etanol hatása a sigB és a gsiB gén indukciójára

MINTA	AZ mRNS RELATÍV MENNYISÉGE	
	sigB	gsiB
Kontroll	1	1
3 min.	2,4	7
6 min.	1,6	10,8
9 min.	1,2	8,7
12 min.	0,7	n.a.
15 min.	1,4	9,2
18 min.	n.a.	5,1
20 min.	1,5	11,9
25 min.	1,1	8,5

A 0,235 % (v/v) etanol + 0,8% (v/v) KOH együttes hatására a gsiB közepesen indukálódott, míg szignifikáns sigB indukciót nem tapasztaltunk (9. táblázat).

9. táblázat

Az etanol + KOH-kezelések hatása a sigB és gsiB gének expressziójára

Minta	mRNS relatív mennyisége 0,235 % etanol + 0,8 % KOH kezelés után		mRNS relatív mennyisége 0,47 % etanol + 0,8 % KOH kezelés után	
	sigB	gsiB	sigB	gsiB
Kontroll	1,0	1,0	1,0	1,0
6 min.	n.a.	n.a.	3,3	48,8
9 min.	1,3	21,7	n.a.	n.a.
12 min.	n.a.	n.a.	n.a.	32,4
15 min.	n.a.	n.a.	1,0	29,3
20 min.	1,4	54	n.a.	n.a.
25 min.	n.a.	1,2	n.a.	n.a.

A 0,47 % (v/v) etanol + 0,8 % (v/v) KOH kezelés hatására erősen megnövekedett *gsiB* mRNS mennyiséget és nagyon alacsony szintű, a szignifikancia határait súroló *sigB* indukciót mértünk (9. táblázat).

A kísérletekben az IS58 törzset használtuk.

4.1.7.2 Aceton-kísérletek

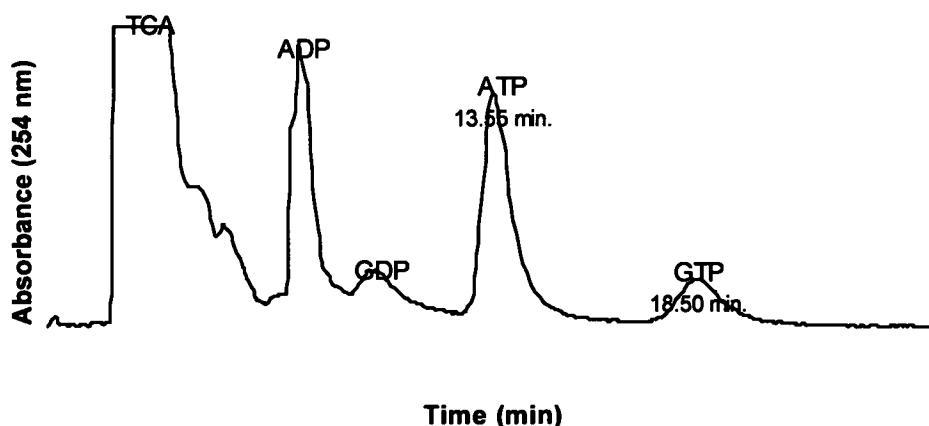
A valinomycin kísérletek oldószerkontrolljaként elvégzett 0,05 % (v/v) végkoncentrációjú aceton-stressz után sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* gén esetében nem sikerült szignifikáns indukciót megfigyelni.

4.2 Módszerfejlesztés: Az ATP és GTP pool analízise stresszhatások után

Bár az ATP-poolt Luciferase assay-el megbízhatóan tudtuk vizsgálni, a módszer természetesen nem volt alkalmas a GTP-koncentráció-változások nyomon követésére. A GTP-pool és az ATP-pool együttes detektálására a HPLC-t választottuk teszt-módszerül, bízva abban, hogy a módszer által lehetővé tett standardizált körülmények között megbízhatóak a mérések. Gondot jelentett, hogy a Luciferase assay-nél használt feltáró oldatból ki kellett hagynunk az EDTA-t, mivel károsította volna az oszlopot. Ennek alapján a következő feltárást alkalmaztuk: 120 μ l 510 mM TCA oldathoz 100 μ l kultúrát adtunk OD₅₅₀ = 1,0 mennyiségben, majd a nukleotidokat 15 percig jégen extraháltuk. Az extrakciót 100 μ l mintának 900 μ l pirogén-mentes, steril (Ph. Eur.) vízben történt hígításával állítottuk le. A mintákat a mérésekig -20 °C-on tároltuk. Ezzel a feltárással sajnos nem sikerült detektálható csúcsokat kapnunk.

Ezután módosítottuk a feltáró procedúrát az alábbiak szerint: A mintákhoz 1/3 vol. 2 M jéghideg TCA oldatot adtunk. A sejteket lecentrifugáltuk (13.000 g, 4 °C, 3 perc). A felülúszó 0,8 vol.-ét leszívtuk, és a sejteket a fennmaradt 0,2 vol. oldatban reszuszpendáltuk. Ezután a sejteket 20 percre -80 °C-ra helyeztük. Ezt követően a baktériumokat felengedtük szobahőmérsékleten, majd megismételtük a fagyasztást. Eztán a sejteket felengedtük szobahőmérsékleten és lecentrifugáltuk (13.000 g, 4 °C, 10 perc). A felülúszót azonnal felhasználtuk a HPLC-s mérésekre, vagy maximum 1-2 napig -20 °C-on tároltuk. A 30. ábra egy ilyen feltárási utáni tipikus HPLC-elválasztás kromatogramját mutatja.

Nukleotidok HPLC-s analízise



A fenti kromatogram alapján megállapítható, hogy az adenosin- és guanosin di- és trifoszfátok detektálható csúcsot adtak, tehát a sejtfeltárás sikeres volt. A csúcsok azonosításánál a (standard-nukleotidok esetében kimért) retenciós időkön kívül segítségünkre volt ismert koncentrációjú nukleotid standardoknak a mintákhoz injektálása is, ami által az egyszer már adott területűnek megmért csúcs alatti terület megnövekedett. A nukleozid-monofoszfátok a TCA-csúcs vállaiként jelentkeznek. A módszer HPLC-s elválasztási részét ellenőriztük nukleotid-keverékekkel is, mely ellenőrzés megerősítette eredményeinket.

4.3 A *Bacillus subtilis* sejtfelszíni stresszválasza

4.3.1 A *B. subtilis* sejtek felszíni hidrofilitásának vizsgálata stresszhatások alatt

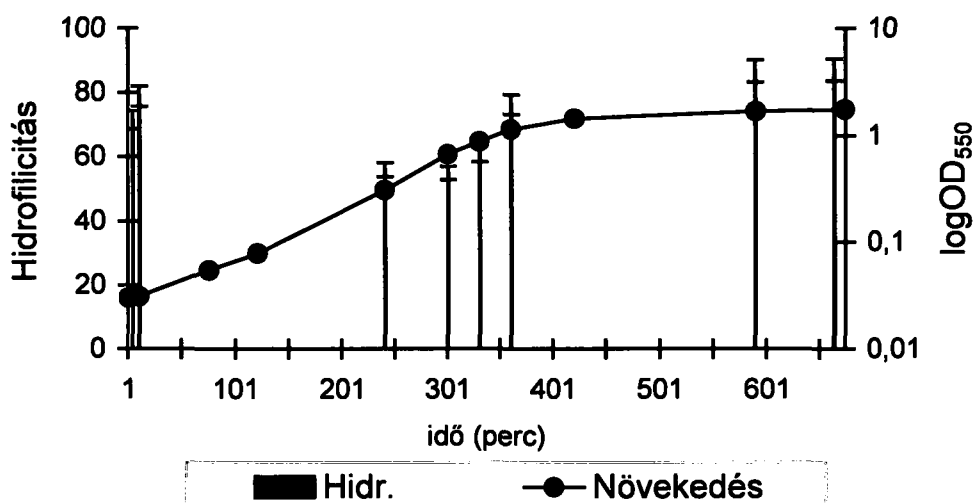
4.3.1.1 A sejtfelszíni hidrofilitás változása a növekedés során

Elsőként stressz-mentes *B. subtilis* sejtek felszíni hidrofilitását határoztuk meg a különböző növekedési fázisokban. A meghatározásokat az anyagok eszközök részben ismertetett

hexadekán-extrakciós módszerrel végeztük ebben és valamennyi ezt követő kísérletekben egyaránt. Az eredmények a 31. sz. ábrán láthatók.

31. ábra

A sejtfelszíni hidrofilitás alakulása a növekedés során



A kísérleteket az 1056 törzsszel végeztük el. Mint az ábrán látható, a lag periódusban, illetve a korai és késői stacionális fázisban hidrofílebb a sejtek felszíne, míg az exponenciális fázisban a sejtek hidrofilitása csökken. Mivel a lag periódus és a stacionális fázis adaptációs fázisokként ismertek, melyek esetében a sejt ki van téve különböző stresszhatásoknak (pl. megváltozott vagy hiányzó C-, N-, P- és energia forrás, pH változás, stb.), nem volt kizárható, hogy ezek a stresszhatások közül egy vagy több okozta az ezen fázisokban tapasztalt hidrofilitás-növekedést. Ezért a továbbiakban szükségesnek láttuk néhány egyedi stresszhatásnak a sejtfelszíni hidrofilitásra gyakorolt befolyásának mérését. Ezek az alábbiak voltak:

4.3.1.2 Az oxigén limitáció hatása a sejtfelszíni hidrofilitásra

A *B. subtilis* obligát aerob mikroorganizmus, mely számára erőteljes stresszhatásként jelentkezik az oxigén parciális nyomásának csökkenése. A stresszhatást a tenyészet rázatásával leállításával értük el. A baktériumok sejtfelszíni hidrofilitása csupán igen enyhe (a szignifikancia határán lévő) növekedést mutatott (10. táblázat). Az eredmények grafikus ábrázolása a 32. ábrán látható.

10. táblázat

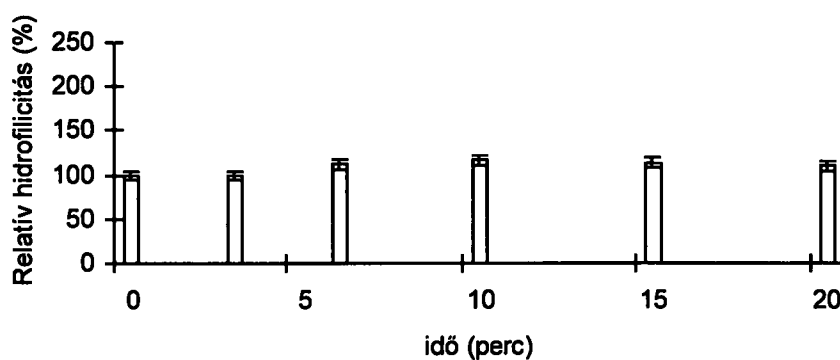
Az O₂ limitáció hatása a *B. subtilis* sejtfelszíni hidrofilitására

MINTA MEGNEVEZÉSE	REL. HIDROFILICITÁS (KONTROLL %-A)
Kontroll	100
3 min.	99,2
6 min.	111,9
10 min.	116,4
15 min.	113,5
20 min.	109,3

Megjegyzendő, hogy a sejtek a növekedési görbe tanúsága szerint (33. ábra) reagáltak a stresszhatásra.

32. ábra

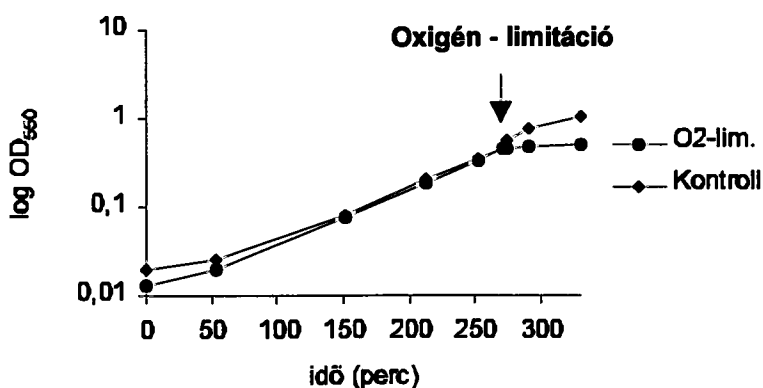
A sejtfelszíni hidrofilitás változása O₂-stressz esetén



A 32. ábrán az érték-tengely skálája a tapasztalt legnagyobb mértékű növekedés skálájának megfelelő értékre van állítva. A kísérleteket az 1056 törzzsel végeztük el.

33. ábra

Az oxigén-stressz hatása a *B. subtilis* növekedésére



4.3.1.3 Hőszokk hatása a *B. subtilis* sejtfelszíni hidrofilitására

A baktériumok sejtfelszíni hidrofilitásának változása nagyobb mértékű növekedést mutatott (11. táblázat), mint O₂ limitáció esetén, bár a változások így is viszonylag (a későbbiekben leírandó sóstresszhez képest) kismértékűek. Az eredmények grafikus ábrázolása a 34. ábrán látható. A hőszokk alkalmazása utáni 10. és 15. perc között a hidrofilitás növekedett, majd a kontroll szint alá csökkent. 30 perccel a kezelés után a hidrofilitás elérte a kontroll értéket. Ez a kinetika jellemző a hőszokk-válaszra: átmeneti „túllövés után” (esetünkben a kontroll szint alá csökkenés) akklimatizálódik a sejt az új hőmérséklethez (eléri a kontroll hidrofilitását). (Schmidt, 1992, Wetzstein, 1992).

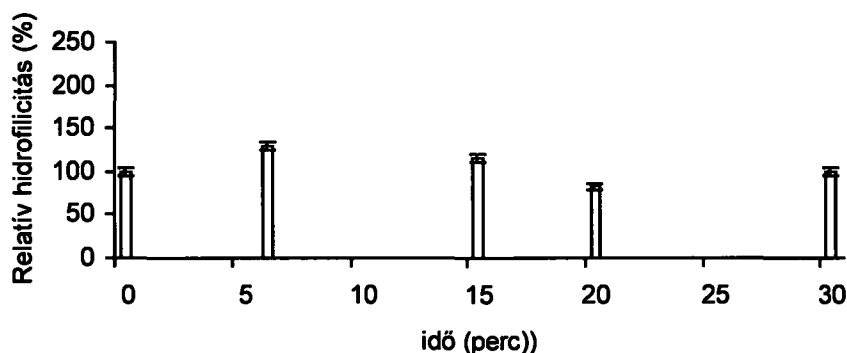
11. táblázat

A hőszokk hatása a *B. subtilis* sejtfelszíni hidrofilitására

MINTA MEGNEVEZÉSE	REL. HIDROFILICITÁS (KONTROLL %-A)
Kontroll	100
6 min.	129,4
15 min.	116,3
20 min.	82,8
30 min.	99,6

34. ábra

A sejtfelszíni hidrofilitás változása hőszokk esetén



A 34. ábrán az érték-tengely skálája a tapasztalt legnagyobb mértékű növekedés skálájának megfelelő értékre van állítva.

A kísérleteket az 1056 törzsszel végeztük el.

4.3.1.4 Sóstressz

A sóstresszt az anyagok és módszerekben leírtaknak megfelelően alkalmaztuk. A kezelés hatására igen nagymértékben és tartósan megnövekedett a sejtek felszíni hidrofilitása (12. táblázat).

12. táblázat

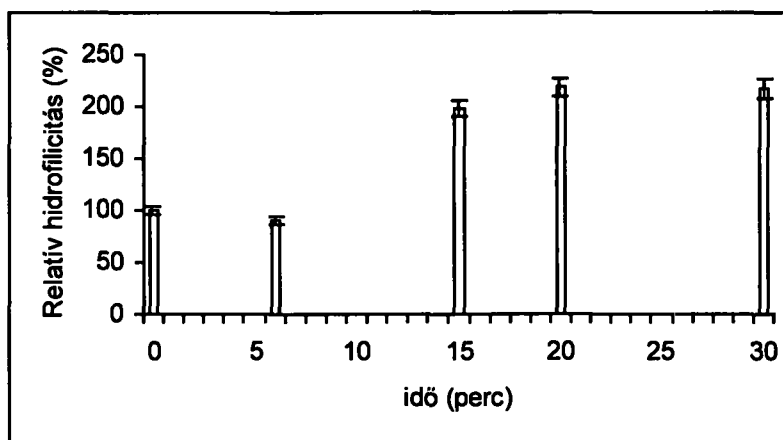
A sóstressz hatása a *B. subtilis* sejtfelszíni hidrofilitására

MINTA MEGNEVEZÉSE	REL. HIDROFILICITÁS (KONTROLL %-A)
Kontroll	100
6 min.	90,53
15 min.	197,7
20 min.	219,1
30 min.	217,3

Megjegyzendő, hogy a 6 perces mintánál a sejtek felszíne enyhén hidrofóbabb lett a kezeletlen kontrollhoz képest. Az eredmények grafikus ábrázolása a 35. ábrán látható.

35. ábra

A sejtfelszíni hidrofilitás változása sóstressz esetén



A kísérleteket az 1056 törzsszel végeztük el.

4.3.1.5 Savstressz

A pH csökkentését 5,0 értékre az anyagok és módszerek részben leírtaknak megfelelően végeztük. A savstressz szignifikáns változást a kezeletlen kontroll sejtek felszínének

hidrofilicitásához képest nem okozott. A savstressz kezelés befolyásolta a baktériumok növekedését.

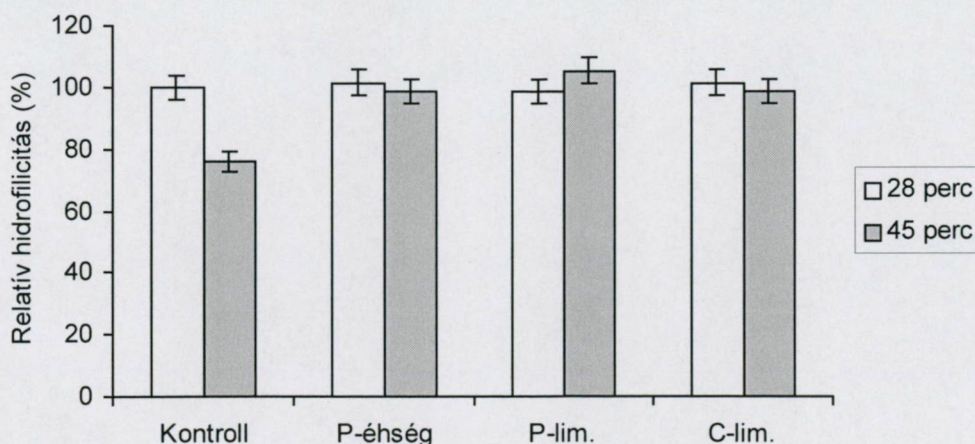
4.3.2 A sejtfelszíni hidrofilicitás-változások néhány lehetséges belső szignálja

4.3.2.1 Éhezési kísérletek

A foszfát-mentes médiumban a baktériumok beszüntették növekedésüket. Amint a **36. ábrán** egyértelműen látszik, a médium teljes foszfát-hiánya a sejtfelszíni hidrofilicitás megnövekedését okozta a kezeletlen kontrollhoz képest, a 45 perces megfigyelési periódus alatt: a 45 perces kontroll hidrofilicitása a 28 perces kontrollhoz képest lecsökkent, míg a stresszelt mintáé változatlan maradt. Megjegyzendő, hogy valamennyi minta a 28 perces kontroll hidrofilicitásának %-ában lett ábrázolva. A kontrollokban és a stresszelt sejtekben az első 30 percben mért megnövekedett hidrofilicitás valószínűleg a centrifugálás és a reszuszpendeálás mechanikai stresszhatásának köszönhető. A foszfát és a C (energia) limitációnál a sejtfelszíni hidrofilicitásnak a foszfát-éhségéhez nagyon hasonló megnövekedését lehetett megfigyelni (**36. ábra**). Az adatokat a **13. táblázat** tartalmazza. A kísérletekben az 1056 törzset használtuk.

36. ábra

A B. subtilis hidrofilicitásának változása tápanyag-éheztetésre és limitációra



13. táblázat

A tápanyag-éheztes és limitációk hatása a *B. subtilis* sejt felszíni hidrofilitására

MINTA MEGNEVEZÉSE	REL. HIDROFILICITÁS (28 PERCES KONTROLL %-A)
28 perces kontroll	100
45 perces kontroll	75,9
28 perces P-éhség	101,4
45 perces P-éhség	98,5
28 perces P-limitált	98,5
45 perces P-limitált	105,2
28 perces C-limitált	101,4
45 perces C-limitált	98,7

4.3.2.2 Mikofenolsavas kezelés

Az MPS kezelést követően 20 perccel a sejt felszíni hidrofilitás kismértékben megnövekedett (37. ábra). Ugyanebben az időpontban jelentős GTP- és ATP drop következett be. Harminc perccel a stressz alkalmazását követően a GTP-drop folytatódott, viszont az ATP-pool az emelkedés jeleit mutatta (37. ábra), miközben a sejt felszíni hidrofilitás igen jelentősen megnövekedett. Ezek az eredmények valószínűsítették, hogy a GTP- és/vagy az ATP-drop az MPS kezelésnél a sejt felszíni hidrofilitás emelkedését okozó jelátvivő folyamatnak eleme lehet.

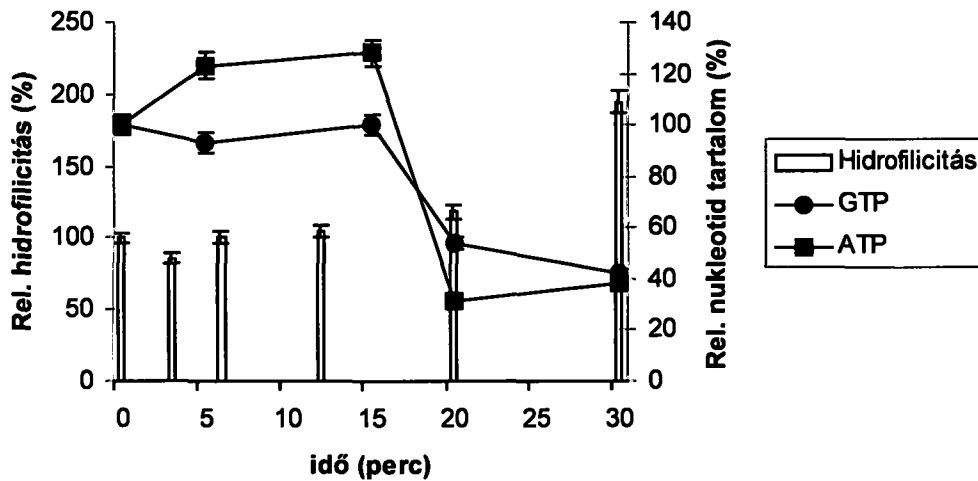
Az eredmények táblázatos formában a 14. táblázatban találhatóak.

A 37. ábrán a hidrofilitás illetve az ATP és a GTP koncentrációk is a kezeletlen kontroll megfelelő paramétereinek %-ban kifejezett relatív adatok.

A kísérletekben az 1056 törzset használtuk.

37. ábra

A sejtfelszíni hidrofilitás, az ATP- és GTP-poolok változása MPS-kezelés után



14. táblázat

A sejtfelszíni hidrofilitás, az ATP- és GTP-poolok változása MPS-kezelés után

MINTA	REL. HIDROFILICITÁS (%)	REL. ATP-POOL (%)	REL. GTP-POOL (%)
Kontrol	100	100	100
3 min.	85,7	123	93
6 min.	100,4	n.a.	n.a.
12 min.	105,1	n.a.	n.a.
15 min.	n.a.	128	100
20 min.	118,3	31	54
30 min.	194,3	38	42

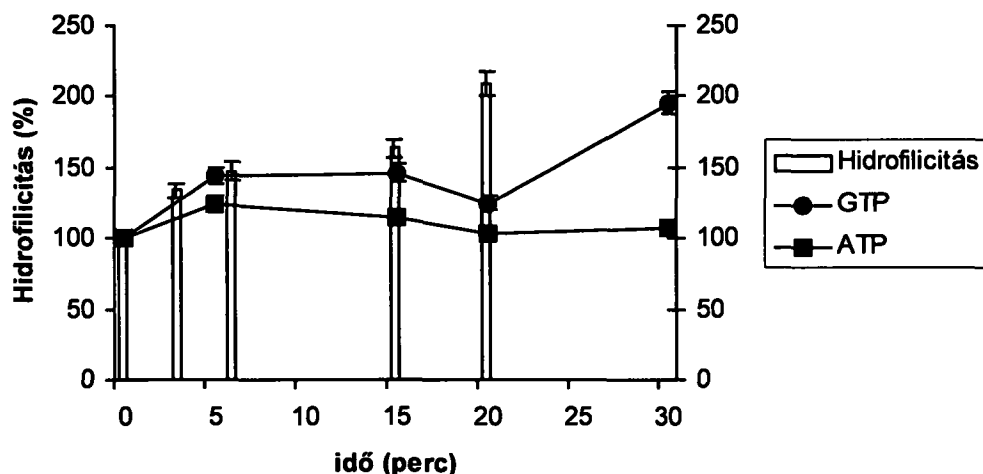
4.3.2.3 2,4-Dinitrofenol-kezelés

A 2,4-DNP kezelést követően 3 perccel a sejtfelszíni hidrofilitás kismértékben megnövekedett (38. ábra). Ugyanebben az időpontban kismértékű ATP- és valamivel nagyobb mértékű GTP-koncentrációemelkedés következett be. Húsz perccel a stressz alkalmazását követően a sejtfelszíni hidrofilitás igen magas értéket ért el (38. ábra), miközben az ATP koncentráció a kontroll értékével megegyezett, a GTP-koncentráció pedig 125 %-a volt annak. Ezek az eredmények szerint a GTP- és az ATP-drop közvetlen jel

szerepe a hidrofilitás növekedésében kizárható. Az eredmények táblázatos formában a 15. táblázatban találhatóak.

38. ábra

A sejtfelszíni hidrofilitás, az ATP- és GTP-poolok változása 2,4-DNP-kezelés után



A fenti ábrán a hidrofilitás illetve az ATP és a GTP koncentrációk is a kezletlen kontroll megfelelő paramétereinek %-ban kifejezett relatív adatok.

15. táblázat

A sejtfelszíni hidrofilitás, az ATP- és GTP-poolok változása 2,4-DNP-kezelés után

MINTA	REL. HIDROFILICITÁS (%)	REL. ATP-POOL (%)	REL. GTP-POOL (%)
Kontrol	100	100	100
3 min.	133,6	n.a	n.a
5 min.	n.a.	124	144
6 min.	147,4	n.a	n.a.
15 min.	163,3	115	146
20 min.	208,8	103	125
30 min.	n.a.	108	195

A kísérletekben az 1056 törzset használtuk.

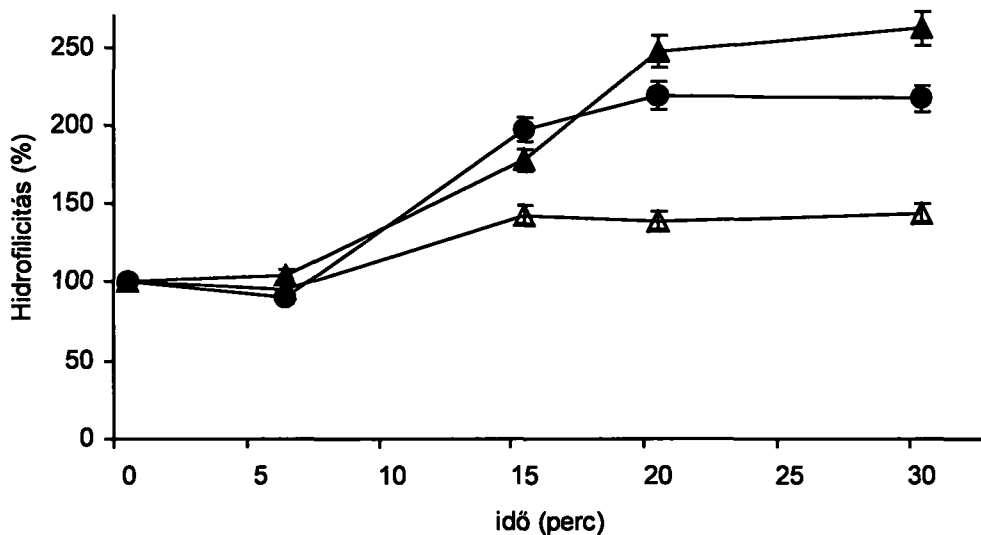
4.3.2.4 A DegS/DegU kétkomponensű rendszer szerepe

Tekintettel a sóstressz esetén tapasztalt nagymértékű hidrofilitás-emelkedésre, illetve figyelembe véve a DegS/DegU rendszernek (a bevezető részben említett) a sóstresszben

betöltött szerepét, nem zárhattuk ki, hogy ez a kétkomponensű rendszer szerepet játszhat a sejtek felszíni hidrofilitásának sóstressz esetén bekövetkező nagymértékű emelkedésében. A kísérletekhez a (szakirodalomban ismert többi DegS/DegU-kísérletekkel való összehasonlíthatóság miatt, (Dartois, 1998)) a 168 törzset, illetve az ebből előállított, *degU*-deléciót hordozó QB4487 törzset használtuk. A két törzs izogenetikus, eltekintve a *degU*-deléciótól a QB4487 törzsben. Az eredmények grafikus ábrázolása a **39. sz. ábrán** látható.

39. ábra

A hidrofilitás változása NaCl stressz után az 1056, 168, QB4487 törzsekben



Az ábrán kör jelöli az 1056 törzs, teli háromszög a 168 törzs és üres háromszög a QB4487 törzs hidrofilitását. Mint az ábrán látható, az 1056 és 168 törzs hidrofilitás-változási kinetikája között csupán csekély különbségek mutatkoznak. Ezzel szemben a QB4487 törzs esetében a NaCl-stresszre jellemző hidrofilitás-növekedés jóval alacsonyabb szintű a vad típusú törzseknél mértnél. Az eredményeket táblázatos formában részben a **12. táblázat** (1056 törzs), részben pedig a **16. táblázat** (168 és QB4487 törzs) tartalmazza.

16. táblázat

A sejtfelszíni hidrofilitás-változása a 168 és a QB4487 törzsben sóstressz után

MINTA	168 REL. HIDROFILICITÁSA	QB4487 REL. HIDROFILICITÁSA
kontroll	100	100
6 min.	104	96
15 min.	178	143
20 min.	247	139
30 min.	262	144

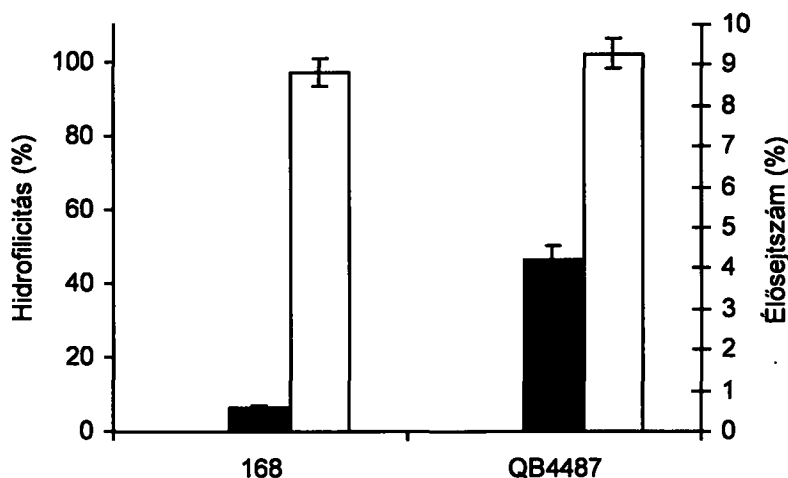
4.3.3 A hidrofilitás-változás fiziológiai szerepe

4.3.3.1 A hidrofilitás szerepe a túlélésben sóstressz esetén

A 168-as és a QB4487-es törzsek növekedésében nem mutatkozott szignifikáns eltérés sóstressz esetén az előző pontban részletezett kísérletben, amikor a rázatott tenyészetben szaporodó sejteket tettünk ki NaCl stressznek. Szükségesnek tartottuk azonban megvizsgálni, hogy miként viselkedik a vad törzs (168) és a *degU* deléciós mutáns (QB4487) Petri-csésze felületén kitapadt állapotban. A törzseket (az Anyagok és módszerek részben leírtaknak megfelelően) növesztettük NaCl-ot tartalmazó illetve kontrollként NaCl-ot nem tartalmazó agarral szilárdított táptalajon. A 24 órás tenyészetnél az élősejtszámot illetve a sejtek hidrofilitását határoztuk meg. Az eredmények a **40. ábrán** láthatóak.

40. ábra

A kitapadt sejtek hidrofilitása és élősejtszáma



A fenti, **40. ábrán** a teli oszlopok az élősejtszámot, míg az üres oszlopok a sejtfelszíni hidrofilitást ábrázolják, mindkét paramétert a kezletlen kontrollhoz viszonyítva.

A **40. ábrán** látható eredmények szerint, a 168-as és a QB4487-es törzs esetében a sejtek kontrollhoz viszonyított felszíni hidrofilitásának alakulása nem tért el egymástól. Ezzel szemben, érdekes módon, a *degU* deléciót hordozó törzs kb. 7-szer jobban tolerálta a NaCl stresszt.

Az eredményeket táblázatos formában a **17. sz. táblázat** tartalmazza.

17. táblázat

A 168 és a QB4487 törzs túlélése és hidrofilitása szilárd táptalajon

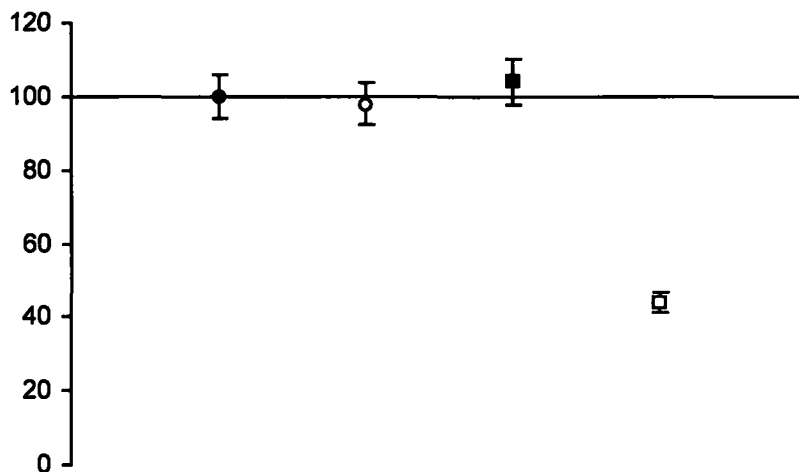
MEGNEVEZÉS	168	QB4487
Hidrofilitás (% kontroll)	97	102
Élősejtszám (% kontroll)	0,6	4,2

4.3.3.2 A DegS/DegU-rendszer szerepe a sejtek kitapadásában stressz alatt

A kísérleteket a 168-as és a QB4487-es törzsekkel végeztük el, az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. A *degU* deléciós mutáns eltérően viselkedett a kitapadási tulajdonságait tekintve a vad típusú törzstől: NaCl stressz esetén erősebben tapadt a szilárd hordozóhoz (41. ábra). Érdekes, hogy a stresszelt 168-as törzs közel azonos mértékben volt jelen az oldatban, mint a kezeletlen kontroll. Ennek lehetséges magyarázatát a diszkusszió részben adjuk meg.

41. ábra

A DegS/DegU rendszer hatása a sejtek kitapadására NaCl stressz alatt



Az ábrán a kör a 168-as, míg a négyzet a QB4487-es törzset jelöli. A teli szimbólumok a kezeletlen kontrollt, az üres szimbólumok pedig a stresszelt mintákat jelölik.

5 Diskusszió

5.1 A σ^B regulon aktivációjához szükséges közvetlen jel

Munkánk egyik fő célkitűzése volt olyan intracelluláris jelet találni, ami feltétlenül szükséges a σ^B regulon indukciójához. A σ^F -el való szabályozásbeli hasonlóságok miatt, illetve mivel a σ^F -ről ismert volt, hogy az ATP drop az aktiválásának fő szignálja, először az energiasstresszt vizsgáltuk.

Tekintettel arra, hogy munkánk jelentős részben az intracelluláris ATP-koncentráció megváltoztatására irányult, fontosnak tartjuk, hogy röviden összefoglaljuk az ATP-bioszintézisének főbb jellemzőit. Az alább ismertetendő rész (kivéve, ahol külön hivatkozást jelöltünk) megtalálható Harold 1986-os munkájában. Az ADP foszforilálása ATP-vé elsősorban a Mitchell-féle kemiozmotikus elmélet alapján történik, mely szerint az oxidatív folyamatok révén nyert energia egy részét (a szubsztrát-foszforilációt kivéve) a sejt elektrokémiai potenciálgradiens felépítésére használja. Az elektrokémiai potenciálgradiens ($\Delta\mu_H$) a sejt belseje felé mutat, és a sejt ezt háromféle módon használhatja fel: energizálhat transzport-folyamatokat, melyek az elektrokémiai potenciálgradiens ellenében mennek végbe, az intracelluláris térbe áramló H^+ -ok közvetlenül energiát biztosítanak a csilló-mozgás számára (256 db H^+ szükséges 1 fordulathoz) (Szabó, 1994), illetve a sejt az F_1F_0 ATP-áz segítségével ATP-t szintetizálhat. Az elektrokémiai potenciálgradiens két részből, az elektromos- ($\Delta\Psi$) és a kémiai potenciálgradiensből épül fel. A kémiai potenciálgradiens a H^+ ionok eloszlásának sejten belüli és sejten kívüli különbségéből adódik, és a ΔpH -val azonos (a sejt környezete savasabb). Az elektromos potenciálgradienst az elektromos töltések sejten belüli és sejten kívüli eloszlásbeli különbsége hozza létre (a sejt belseje negatívabb). A légzési elektrontranszport láncnak ezzel az erővel szemben munkát végezve kell a H^+ ionokat a sejt környezetébe pumpálnia, melyhez az energiát az oxidatív folyamatok biztosítják. A redox-folyamatokban részt vevő elektron-donor oxidált és az elektron akceptor redukált formájának redoxpotenciálja között kb. 200 mV potenciálkülönbségnek kell lennie ahhoz, hogy –miután az elektron ezt a „potenciál-völgyet” bejárta– a rendszer 2 H^+ kipumpálása útján egy molekula ATP szintéziséhez elegendő energiát tároljon. Gyakran használatos terminus technicus a proton motive force (PMF), ami az elektrokémiai potenciálgradiens és a Faraday-állandó hányadosa. A PMF optimális fiziológiai körülmények között legnagyobb részben a $\Delta\Psi$ -ből (90%) épül fel, ilyenkor a ΔpH részaránya csupán kb. 10 %.

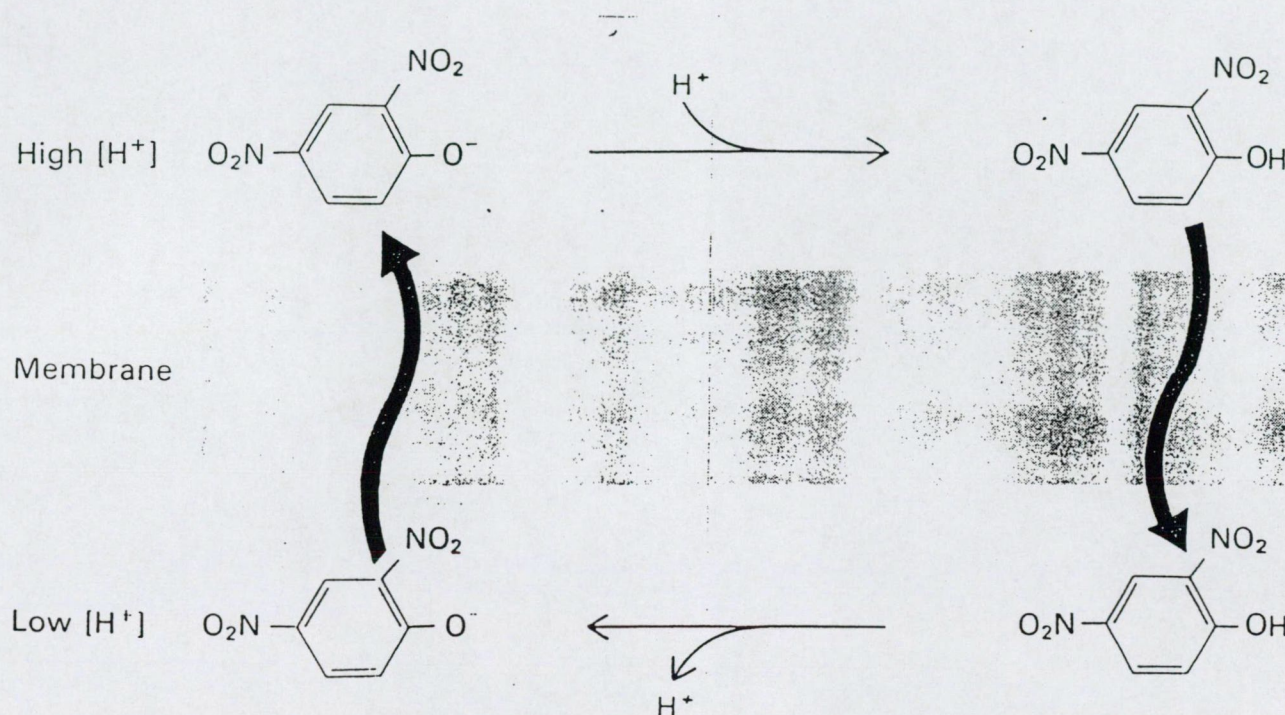
Szétkapcsoló szereknek azon anyagokat nevezzük, melyek –a proton-pumpák révén-kialakított proton motive force (PMF) elherdálása által lehetetlenné teszik az F_1F_0 ATP-ázon

keresztüli ATP-szintézist, tehát amelyek az ATP-szintézis számára biztosított energiát a felhasználótól szétválasztják.

A kísérletekhez felhasznált szétkapcsoló szer a 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) volt, melynek képletét és hatásmechanizmusát a **42. sz. ábra** szemlélteti.

42. ábra

A 2,4-DNP képlete és hatásmechanizmusa



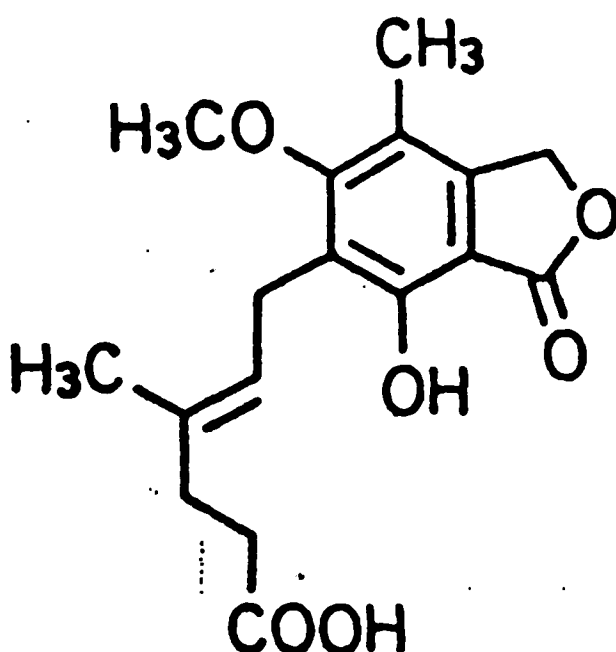
A 2,4-DNP lipid-oldékony anyag lévén könnyen diffundál a sejtmembránban, koncentrációgradiense által megszabott irányba. Savdisszociációs állandójától és a közeg pH-jától függően protonált és deprotonált állapotban lehet jelen, mely tulajdonsága és nagyfokú membrán-permeabilitása eredményeképpen H^+ -ionokat szállít elektrokémiai potenciálgradiensükkel megegyező irányba (megfelelő körülmények esetén a sejt belseje felé), ily módon a tárolt energiát kisütve.

A 2,4-dinitrofenol igen erős induktornak bizonyult, az ATP-poolt viszont csupán kismértékben befolyásolta (a kontrollhoz képest 85 %-ra csökkent). Ez az eredmény valószínűsítette az ATP-drop közvetlen jel szerepét, azonban (mivel a GMP-szintetáz működése során ATP-t igényel) nem volt kizárható a GTP-drop közvetlen jel szerepe sem. Ezért végeztük el az MPS-kísérleteket. (A könnyebb követhetőség kedvéért a purin-nukleotid bioszintézis végső lépéseit a **44. ábrán** feltüntettük). A mikofenolsav (**43. ábra**) egy

antibiotikum, mely xantozin-monofoszfát analóggént gátolván az IMP-dehidrogenázt és a GMP-szintetázt, csökkenti a GMP, GDP és GTP sejtbeli koncentrációját (Wu and Scrimgeaur, 1973).

43. ábra

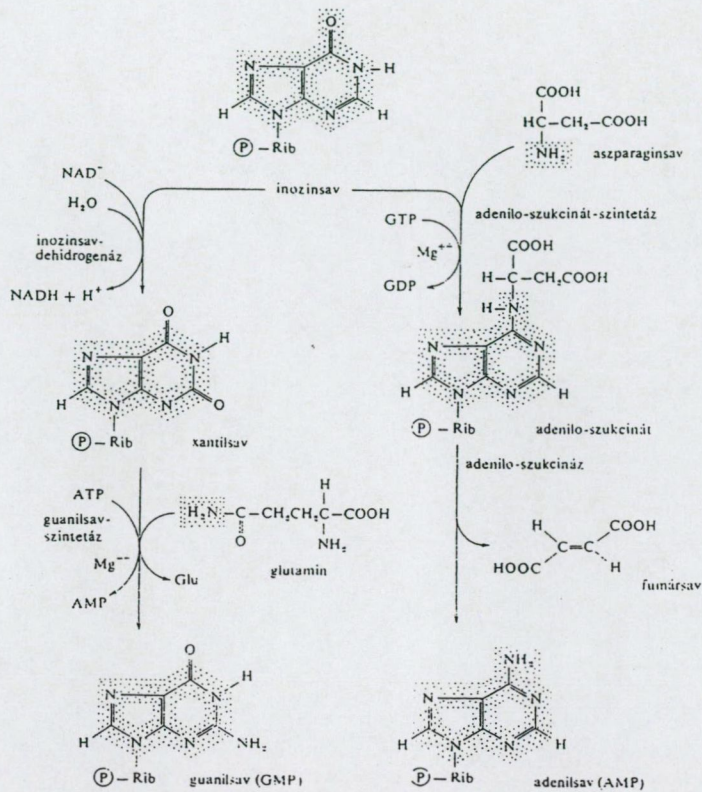
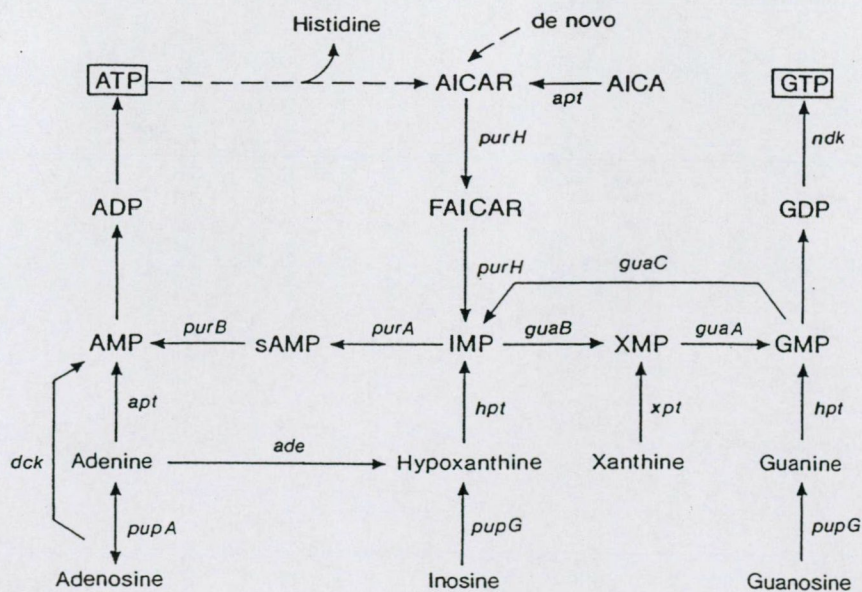
A mikofenolsav képlete



Mivel az adeniloszukcinát-szintetáz működéséhez GTP-t igényel, ezért nem volt kizárható, hogy az MPS negatívan befolyásolja az ATP-poolt is.

Az MPS-kezelés után B. Maul mérései jóval nagyobb mértékű ATP-koncentráció csökkenést mutattak, mint a 2,4-DNP kezelés esetén, ennek ellenére a σ^B regulon indukció rendkívül alacsony, a szignifikancia határait súroló volt. A növekedési görbe is tanúsította, hogy az MPS-kezelés erősen hatást gyakorolt a baktériumokra. Ezek az eredmények valószínűsítették, hogy az ATP-drop közvetlen jel-szerepe kizárható. Tekintettel azonban a σ^F -el való analógiára, mindenképpen szükséges volt közvetlen bizonyítékokat szolgáltatni az ATP-drop ezen feltételezett szerepének kizárására. Ezért munkánkat a nukleozid-kiegyenlítési kísérletekkel folytattuk. Ezek ismertetése előtt azonban szükséges a *B. subtilis* purin nukleotid salvage pathways felvázolása (45. ábra).

A purin-nukleotid bioszintézis végső lépései

Purin nukleotid salvage pathways *B. subtilis*-ben (Nygaard et al., 1997)

A *Bacillus subtilis* két, egymástól szeparált, energia-függő transzportrendszer segítségével képes mind az adenosin, mind pedig a guanosin felvételére (Nygaard et al., 1997). Az

adenozinból az adenosin-foszforiláz segítségével a baktérium adenint, majd ebből az adenosin-foszforibozil-transzferáz révén AMP-t állíthat elő. Az adenosinból más úton, a deoxicitidin-kináz közreműködésével, közvetlenül is keletkezhet AMP.

A guanosinból a guanosin-foszforiláz guanint, ebből pedig a hipoxanthin-foszforibozil-transzferáz GMP-t állíthat elő.

Az adenin- és guanin nukleotidok egymásba is alakulhatnak: a GMP-ből a GMP-reduktáz IMP-t gyárthat, melyből a purin bioszintézisnél már ismertetett módon AMP és GMP egyaránt létrejöhet. Az adeninből deaminálás után (adenin-deamináz) hipoxinthin jöhet létre, melyből a hipoxanthin-foszforibozil-transzferáz készíthet IMP-t.

Az MPS hatása a növekedési görbe és a σ^B -regulon expressziós elemzése szerint teljesen ellensúlyozható volt adenosin hozzáadásával. Ebben az esetben az addenosin GMP-vé alakulása kizárható volt, ugyanis ez csak IMP-n keresztül történhet, mely enzimeket gátolt a mikofenolsav. Ez az eredmény önmagában nem mondott ellent az ATP-drop-hipotézisnek (sőt inkább erősíthette volna azt), azonban tekintettel a kiegyenlítés nélküli MPS-kezelés során tapasztalt alacsony szintű σ^B -függő indukcióra, nem volt meggyőző.

Megjegyzendő, hogy a guanosin ellensúlyozta az MPS hatását, ami nem meglepő, hiszen a sejt így képessé vált GMP előállítására. Azonban fel kell hívnunk a figyelmet arra, hogy ebben az esetben a guanosinnak AMP-vé alakulásának elvi lehetősége fennállt.

Az MPS-kísérletek összefoglalásául megállapítható, hogy ez a gátlószer nem volt alkalmas arra, hogy válaszolhassunk arra a kérdésre, hogy az ATP-drop közvetlen jelként tekintendő-e, bár valószínűsíthető volt, hogy az ATP-drop ilyen irányú szerepe kizárható.

A következőkben a decoyint alkalmaztuk gátlószerként, mely a GMP-szintetázt gátolja. A decoyinin csökkent a sejt GTP-készletét, ugyanakkor ATP-dropot nem okoz. Az ATP-drop hiányának oka nem ismert. A decoyinin-kezelés után B. Maul mérései igazolták, hogy ATP-drop nem következett be, ennek ellenére közepes mértékű *gsiB* és nagyon alacsony szintű *sigB* indukció volt tapasztalható. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy az ATP-drop közvetlen jel szerepe kizárható, hiszen annak hiányában is mérhető expresszió. A decoyinin kísérlet viszont ráirányította figyelmünket a GTP-drop lehetséges közvetlen jel szerepére. Tovább erősítette ezt a hipotézist, hogy guanosinnal a decoyinin hatása ellensúlyozható volt, tehát a decoyinin hatása a guanin-nukleotidok hatására vezethető vissza. Megjegyzendő, hogy a guanosinnak AMP-vé alakulásának elvi lehetősége fennállt.

A GTP-drop szerepét vizsgálándó, megkíséreltük a 2,4-DNP hatását guanosinnal ellensúlyozni. Bár a 2,4-DNP az exponenciális fázisú baktérium növekedését nem

befolyásolta (tehát a guanozin-kezelés az önmagában alkalmazott 2,4-DNP –hez képest védettséget nyújtott), mégis a kezelés erősen indukálta a *sigB* és közepesen erősen a *gsiB* gént. A *gsiB* indukciója jóval alacsonyabb volt, mint az önmagában alkalmazott 2,4-dinitrofenol esetében, azonban a *sigB* indukciója nem mutatott lényeges eltérést a guanozin-kiegyenlítés nélkülihez képest. Ez a kísérlet valószínűsítette, hogy a GTP-drop bár befolyásolja a σ^B -függő indukciót, azonban valószínűleg nem ez a közvetlen szignál. Hangsúlyozandó azonban, hogy a GTP-drop σ^B -függő indukcióban játszott szerepének tisztázására még további kísérletek szükségesek.

A GTP- és ATP-esés az Eredmények részben ismertetett módon hozzájárulhat az un- és misfolded fehérjék koncentrációjának intracelluláris növekedéséhez. Az un- és misfolded fehérjék pedig stressz-szignálként szolgálnak az *E. coli* hősokk-válaszában (Bukau, 1993). Ezt a hatást a puromicin nevű antibiotikummal kívántuk modellezni *B. subtilis*-ben. A puromicin a transzláció elongációs fázisát blokkolja. Hatása alapját képezi, hogy tirozil-tRNS analóg, és képes a riboszómához kötődni. A riboszómához való kötődés után kialakul az előző aminosavval a peptid-kötés, de a puromicin több peptid-kötés kialakítására már nem képes, és könnyen ledisszociál a riboszómáról. A hatás eredményeképpen abnormális lánc-termináció következik be, ami un- és misfolded fehérjék kialakulásához vezet. A kezelés eredményeképpen közepesen erős *sigB* és erős *gsiB* indukció volt megfigyelhető. Azonban az a tény, hogy ugyanakkor –mivel valószínűleg a sejt energizálását célzó enzimek is károsodtak- igen erős ATP-drop volt megfigyelhető, megkérdőjelezte a hibás konformációjú fehérjék szignál szerepét. Ezek jel-szeropének tisztázásához ugyanakkor még további kísérletek szükségesek. A σ^B -regulon indukciójának és az ATP-drop kinetikájának eltérő volta (23. ábra) ismét bizonyította azt, hogy az ATP-drop közvetlen szignál szerepe kizárható.

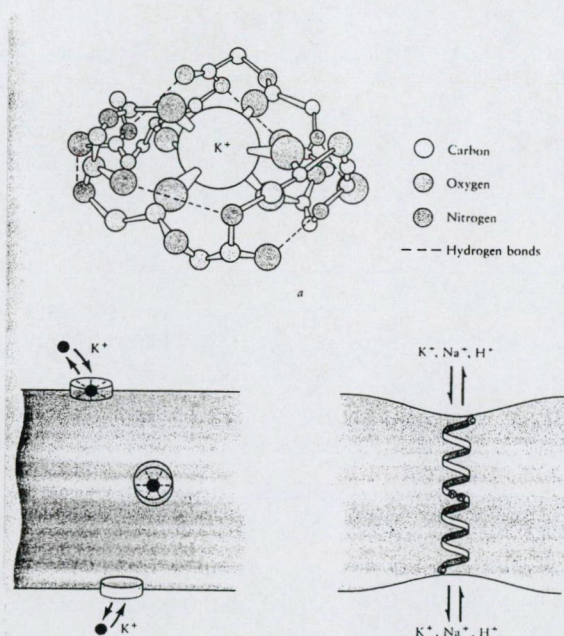
Feltűnő volt, hogy az eddigiek során a 2,4-DNP kezelés hatására következett be a σ^B regulon legnagyobb mértékű indukciója. Fontos megjegyezni, hogy a 2,4-DNP hatására nemcsak ATP-drop következett be, hanem –mivel a 2,4-DNP H^+ -ionokat szállít az extracelluláris térből a sejt belsejébe- intracelluláris savasodás és a sejt belsejébe irányuló $+$ -töltés transzport is. Ez utóbbi effektust kívántuk a valinomycin nevű, K^+ specifikus ionoforral vizsgálni. Az ionoforok antibiotikum-természetű anyagok, melyek antibiotikus hatásukat azáltal fejtik ki, hogy permeabilisabbá teszik a sejtmembránt, melynek következményeként felborul a sejt ion-egyensúlya, és az ATP-szintézis is károsodhat. Egy speciális ionofor (a protonofor természetű) 2,4-dinitrofenol stresszfehérje-szintézisre gyakorolt induktív hatását az előzőekben már jellemeztük *Bacillus subtilis*-ben

Az inoforok egyik fajtája hidrofil csatornák képzése révén a csatorna átmérője által megszabott méretű ionok számára szabad utat biztosít a membránon keresztül (pl. gramicidinek), míg mások az iont belső (hidrofil) részükkel kötik és külső (hidrofób) burkuk révén a membránban szabadon diffundálva a facilitált diffúzió elve alapján szállítják. Mindkétféle transzport az ion elektrokémiai potenciálgradiense által megszabott irányba történik.

A valinomycin karperec alakú oligopeptid molekula (**46. ábra**). Belső átmérője nagyfokú K^+ -ion-specifitást kölcsönöz számára, affinitása a hasonló méretű Na^+ -hoz kb. tízezerszer kisebb. A kötés karboxil-csoportok segítségével történik. Az ion transzportja (kémiai potenciálgradiensének megfelelően) a sejt belseje felé történik, melyet passzív H^+ kilökődés követ (**46. ábra**).

46. ábra

A valinomycin képlete és hatásmechanizmusa



Megfelelően magas (minimum 10 mM) K^+ koncentráció esetén azonban a valinomycin nem csökkenti az ATP-poolt, mivel a K^+ bevitelt passzív H^+ kilökődés kíséri (Harold, 1986). Kísérleteink során a tápoldatban a K^+ koncentráció 27 mM volt, illetve B. Maul mérései is bizonyították, hogy nem következett be ATP-drop. A valinomycin hatását ugyanakkor jelezte, hogy a kezelést követően az exponenciális növekedésű sejtek stacionális fázisba léptek. A

sigB és a *gsiB* gének nagyon erősen indukálódtak valinomycin-kezelés hatására. Azt, hogy K^+ -terhelés specifikus volt-e az indukció, sav-stressz kísérletekkel vizsgáltuk, ekkor ugyanis H^+ -terhelésre számítottunk. pH = 6,0-nél a *sigB* viszonylag kismértékű, a *gsiB* viszont erős indukciót mutatott. Megjegyzendő, hogy a pH = 6,0 stressz enyhe sav-stressznek számít, mivel ez az első olyan savas pH-érték, ahol eltérés tapasztalható a pH = 7,5 értéken való növekedéshez képest. Megjegyzendő, hogy korábban már igazolták, hogy a σ^B regulonba tartozó *ctc* gén indukálódik pH = 5,25 értékű, sav-stressz hatására. A *ctc* esetében leírt indukciós profil eltért az általunk megfigyeltektől, aminek okozója az lehetett, hogy a *ctc* esetében az általunk alkalmazotthoz képest drasztikus mértékű stresszt alkalmaztak.

Lényeges pont, hogy a sav-stressz kísérletek során a σ^B regulonnal rendelkező sejtek gyorsabban nőttek a $\Delta sigB$ mutánsnál pH = 6,0 – 5,0 között a korai stacionáris fázisban. Ez volt az első olyan fenotipikus különbség, amit sikerült a vad és a σ^B -mutáns sejtek között találni, és ami globális funkciót rendelt hozzá a szigma-faktorhoz: védettséget nyújt sav-stressz ellen. (Binnie et al., 1986, Duncan et al., 1987, Hecker et al., 1989, Boylan et al., 1993). Megjegyzendő, hogy mint a bevezető részben említettük, 1988-as közlés szerint (Truitt et al., 1988) a σ^B -függő *ctc* gén hiánya esetén a *B. subtilis* sporulációja gátolt 48 °C-on, illetve a σ^B regulon védelmet nyújt kumain-hidroperoxid ellen (Antelmann et al., 1996). Ez a két publikáció azonban tekintettel a σ^B regulonba tartozó gének által kódolt fehérjék nagy számát (részletezve a bevezető részben), nem rendelt a regulonhoz globális funkciót, azaz nem tudott olyan szerepet adni a regulonnak, ami magyarázta volna a stresszfehérjék nagy számát. Az első ilyen funkció három, egy időben megjelent publikációban látott napvilágot: a σ^B regulon védettséget nyújt sav-stressz ellen *Listeria monocytogenes*-ben (Wiedmann et al., 1998 július), a σ^B regulon védettséget nyújt sav- és lúg stressz ellen *B. subtilis*-ben (Gadienko et al., 1998 július), illetve a σ^B regulon védettséget nyújt enyhe sav-stressz ellen *B. subtilis*-ben (Kovács et al., 1998 augusztus). Megjegyzendő, hogy a késői logaritmikus fázisban a mutáns sejt nőtt gyorsabban, ami a következőképpen magyarázható: a σ^A ismeri fel azon gének többségét, melyek az exponenciális fázis során expresszálódnak. A σ^B és a σ^A ugyanahhoz az RNS polimeráz core enzimhez kötődik, tehát a vad törzsben versenyeznek a core-hoz való kötődésért anélkül, hogy a σ^B még (a szükséges idő hiánya miatt) szignifikáns protektív szerepet tudna kifejteni. Nyilvánvalóan ilyen versenyzés nincs a *sigB* deléciós mutánsban, tehát ebben relatíve több σ^A -RNS polimeráz van. Később azonban szintetizálódnak a σ^B -függő fehérjék és be tudják tölteni protektív szerepüket.

A fenti kísérletek eredményei tehát a pH-stresszre irányították figyelmünket. Mivel valamennyi eddigi eredményünk, illetve a szakirodalomban fellelhető eredmények (Maul et al., 1995, Völker et al., 1994, Voelker et al., 1995, Hecker and Völker, 1998) szerint az ATP-

drop indukálja a σ^B regulont, célul tűztük ki, hogy úgy okozunk ATP-dropot, hogy közben lehetőleg ne indukáljuk a regulont. Amennyiben ugyanis ezt a célkitűzésünket sikerül megvalósítani, megtaláljuk a keresett közvetlen szignált, azaz (legalábbis energiastressz esetén) a σ^B –függő indukció alapfeltételét. Ismert volt, hogy nagyon enyhe KOH stresszel el lehet érni, hogy a PMF gyengüljön, tehát ATP-drop jöjjön létre, azonban anélkül, hogy a sejt belső pH-ja megváltozna (köszönhetően a baktérium intracelluláris puffer-rendszereinek) (Kashket, 1982). Az általunk alkalmazott nagyon enyhe KOH-stressz hatékonyan csökkentette az ATP-poolt (nagyobb mértékű csökkenést okozott, mint a 2,4-dinitrofenol), azonban sem a *sigB* sem pedig a *gsiB* gén nem mutatott szignifikáns indukciót. Annak bemutatására, hogy a maximumként tapasztalt „indukció” (1,5-szeres a *sigB* esetén, 4,4-szeres a *gsiB* esetén) nem számít szignifikánsnak, a 18. táblázatban bemutatjuk e 2 gén indukciójának maximális értékeit néhány stressz fajta esetén. A táblázatban feltüntettük a relatív ATP-mennyiséget is.

18. táblázat

A sigB és a gsiB gének indukciójának maximális értéke különböző stressz-fajták esetén

STRESSZ	REL. SIGB INDUKCIÓ	REL. GSI/B INDUKCIÓ	REL. ATP-MENNYISÉG
Hősokk	50 (Völker et al., 1994)	80 (Maul et al., 1995)	133 (Maul et al., 1995)
Sóstressz	10 (Völker et al., 1994)	110 (Maul et al., 1995)	180 (Maul et al., 1995)
Valinomicin	27 (Jelen dolgozat)	400 (Maul et al., 1995)	114 (Maul et al., 1995)
2,4-dinitrofenol	16 (Jelen dolgozat)	90 (Maul et al., 1995)	85 (Maul et al., 1995)

Az eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az intracelluláris pH-változás fontos szerepet játszik a σ^B regulon indukciójában. Amennyiben megvizsgáljuk a jelen dolgozatban szereplő, illetve a szakirodalomban publikált eredményeket, melyeknél a σ^B regulon erős indukciója volt megfigyelhető, az intracelluláris pH-ra vonatkozóan az alábbi változások valószínűsíthetőek: 2,4-dinitrofenol – mivel H^+ ionokat szállít a sejt belsejébe, intracelluláris savanyodást okoz; valinomicin – mivel a K^+ bevitelt passzív H^+ kilöködés követi, valószínűleg intracelluláris lúgosodást okoz; sav-stressz – valószínűleg intracelluláris savasodást okoz; puromicin – valószínűleg a membrán-komponens fehérjékben változást okoz, ami az ion-egyensúly felborulásához vezethet, ami az intracelluláris pH megváltozásához vezethet; NaCl (Völker et al., 1994, Maul et al., 1995) – valószínűleg az ion-egyensúly felborulásához vezethet, ami az intracelluláris pH megváltozásához vezethet; hősokk (Völker et al., 1994, Maul et al., 1995) – befolyásolja a membrán szerkezetet (és a membrán fizikai tulajdonságait), ami a sejten belüli pH megváltozásához vezethet. Ezeket az

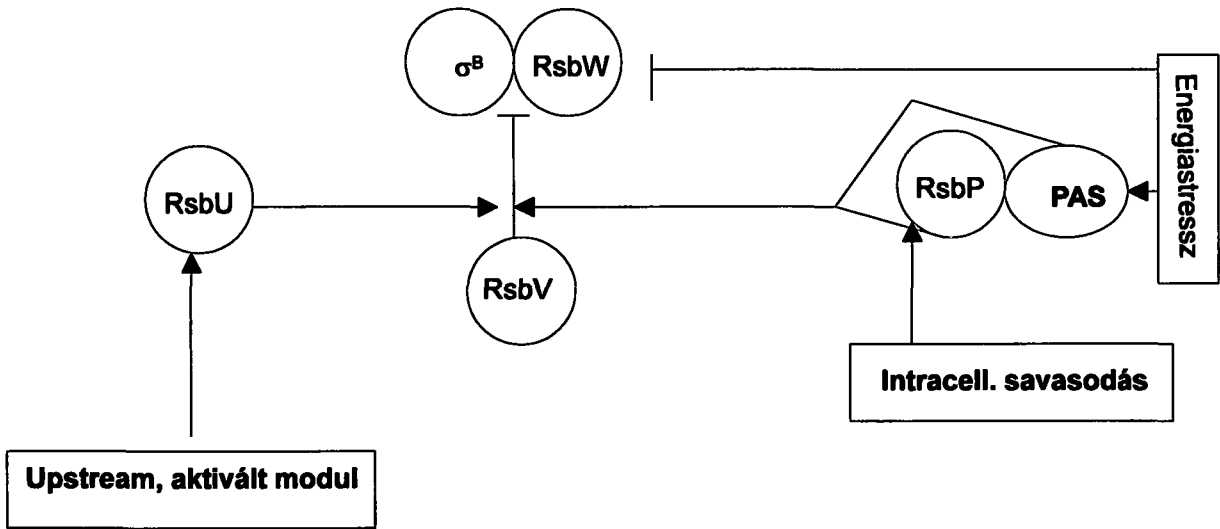
eredményeket amennyiben összevetjük a KOH-stressz esetében tapasztalt eredménnyel (azaz a KOH az ATP-drop ellenére nem okozott σ^B -függő indukciót, mivel valószínűleg nem okozott intracelluláris pH-változást, az alábbi következtetések vonhatóak le:

Bizonyos, hogy az energiasztressz esetében szükséges az intracelluláris pH-változás, mely esetben savasodás szükségessége igazolt, a lúgosodás szerepe pedig valószínűsíthető. A pH-változás szükségességére lehetséges magyarázat, hogy az RsbP PAS, doménje érzékeli ugyan az ATP-stresszt, de nem képes az RsbV~P-t defoszforilálni intracelluláris pH-változás nélkül. Az a hipotézis sem zárható ki, hogy az ATP-drop független stresszeknél szükséges az intracelluláris pH-változás. Ez úgy lehetséges, hogy az aktív RsbU – RsbV~P komplex stabilizálásához szükséges lehet az intracelluláris pH-változás által befolyásolt aktív konformációjú RsbP, ami viszont (mivel ATP-drop nem történt, ezért a foszfatáz domént nem aktiválta a PAS domén), nem rendelkezik az RsbV~P-t defoszforilálni képes enzim-aktivitással. Ezt a hipotézist támasztja alá Voelker és munkatársai eredménye (Voelker, 1996), akik bizonyították ugyan, hogy az RsbU képes az RsbV-hez kötődni, azonban a kötődés stabil volta megkérdőjelezhető az eredményeik alapján.

A fentieket az alábbi két ábra (47. ábra és 48. ábra) mutatja be: az eredményeinkkel módosított, bizonyított szabályozó-mechanizmust (47. ábra), illetve a σ^B regulon hipotetikus szabályozását (48. ábra). Mindkét ábra csupán a downstream modult ábrázolja, mivel eredményeink az upstream modulra vonatkozó ismereteket nem befolyásolták.

47. ábra

A σ^B aktivitásának bizonyított szabályozása

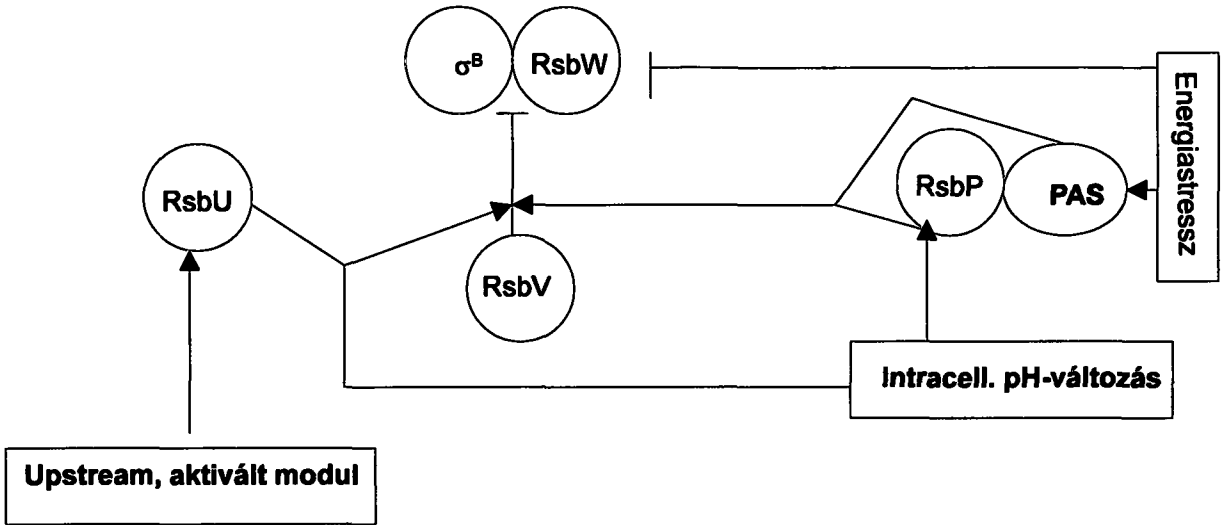


Az ábra szerint a környezeti stresszválaszhoz nem szükséges az intracelluláris pH-változás. Az energiasztresszt a PAS-domén érzékeli, míg az intracelluláris pH-változást az RsbP

katalitikus doménje. (Az intracelluláris pH-változással kapcsolatban megjegyzendő, hogy egyelőre csak az intracelluláris savasodás szerepe bizonyított, a lúgosodásé csak valószínűsíthető). Az intracelluláris savasodás és az ATP-drop együttesen szükséges a σ^B regulon indukciójához, kivételt képeznek ez alól a nem ATP-dropon keresztül ható környezeti stressz-hatások (hősokek, etanol- és NaCl stressz), melyek az RsbU révén képesek az RsbV~P-t defoszforilálni.

48. ábra

A σ^B aktivitásának hipotetikus szabályozása: az előző modell tovább-fejlesztése



A fenti (48. ábrán látható) szabályozásban a 47. ábrán ismertetett szabályozáshoz képest csupán az RsbU-függő út szabályozása módosult, ugyanis ebben az esetben az RsbU – RsbV~P kötés stabilizálásához szükség lenne a pH-változás által „aktív” konformációjú RsbP-re. Az RsbP nem képes defoszforilálni ATP-drop hiányában az RsbV~P-t, csupán az RsbU – RsbV~P komplexet stabilizálja, miáltal elősegíti az RsbU foszfatáz aktivitását. További különbség a 47. ábrához képest, hogy az intracelluláris savanyodáson kívül a lúgosodás is képes a közvetlen jel funkcióját betölteni. Fontos megjegyezni, hogy mind a kétféle szabályozás szerint az RsbW jel-érzékelő szerepe csupán a stresszválasz leállítására szorítkozna: amennyiben elegendően nagy koncentrációjú ATP áll rendelkezésre, az RsbW kináz foszforilálja az RsbV-t, és leköti a σ^B -t.

Az, hogy egyetlen fehérje közvetítse mind a savas mind pedig a lúgos irányú pH-változást nem áll példa nélkül a baktériumok világában: jó példa erre az *Escherichia coli* LexA regulonja. A LexA represszor *Escherichia coli*-ban számos S.O.S. gént (pl. *lexA*, *recA*, *sfiA*) szabályoz, mégpedig pH-függő módon (Dri and Moreau, 1994). pH 7,0-nél ssDNS jelenlétében a RecA hasítja, ami a represszor inaktivációjához vezet. Savas pH-nál a LexA

ön-emésztéssel inaktiválódik, míg lúgos pH-nál a represszor képtelen a DNS-hez kötődni. A *Bacillus subtilis* σ^B regulon szabályozásának esetében az RsbP tölthet be a LexA-hoz hasonló szerepet, bár megjegyzendő, hogy minden valószínűség szerint (legalább az egyik irányú pH-változás érzékeléséhez) szükséges egy vagy több segítő faktor közreműködése.

5.2 A sejtfelszíni szintű stresszválasz

Amint azt a bevezető részben említettük, a *Bacillus subtilis* sejtfelszíni hidrofil/hidrofób jellemzőinek stresszhatások alatti változásáról részletes jellemzés még nem készült, amely jellemzők pedig (legalábbis valószínűleg) szerepet játszanak a sejtek talaj-részecskékhez való kitapadásában. Vizsgálataink célját képezte tehát a sejtek felszíni hidrofilicitásának stresszhatások alatti viselkedésének jellemzése, illetve a kapott információkból egy lehetséges intracelluláris jel-átalakítási út felvázolása, valamint a sejtfelszíni hidrofilicitás változásának (amennyiben van ilyen) fiziológiai szerepének tisztázása (pl. valóban szerepet játszik-e a sejtek kitapadásában, ha igen: miként). A következőkben vizsgálatainkat ennek a három fő kérdésnek megválaszolására összpontosítottuk.

A stressz-mentes körülmények között növekvő *B. subtilis* sejtek esetében megfigyelhető volt, hogy a sejtek felszíne a lag-periódusban és a stacionális fázisban hidrofílebb volt, mint a logaritmikus növekedés során. A lag-periódus és a stacionális fázis adaptációs periódusként ismertek, mikor a sejtek érzékelik a megváltozott környezetet (pl. megváltozott C-, N-, energia-forrás, pH) és megpróbálnak alkalmazkodni ahhoz. A körülmények megváltozása a baktériumok számára mindenképpen stressz-hatást jelent, tehát nem volt kizárható, hogy az adaptációs periódusokban tapasztalt hidrofilicitás-növekedés valamilyen stresszválasz volt. Ennek vizsgálatára a következőkben egyedi stressz-hatások során mértük a sejtek felszíni hidrofilicitásának változását.

Az oxigén-limitáció komoly stresszhatást jelentett a baktériumok számára, mivel azok a tenyészet rázatásának leállítása után azonnal stacionális fázisba léptek. Az oxigén-limitáció hatására azonban csupán igen enyhe felszíni hidrofilicitás-változást tapasztaltunk, aminek szignifikáns volta megkérdőjelezhető.

Az exponenciális fázisú sejteket miután 45 °C-ra helyeztük, a baktériumok sejtfelszíni hidrofilicitása a hősokk-válaszban résztvevő fehérjék génjeinek esetében gyakran megfigyelhető indukciós kinetikához hasonló kinetikát mutatott: a sejtfelszíni hidrofilicitás előbb megnövekedett, majd átmenetileg a kontroll szintje alá süllyedt (tehát a sejtek hidrofóbabbá váltak), végül pedig beállt a kontroll szintjére, ami valószínűleg a sejtek magasabb hőmérsékletre való akklimatizálódását jelentette.



Sav-stressz esetében, bár a stressz befolyásolta a baktériumok növekedését, nem sikerült a kezeletlen kontroll sejtfelszíni hidrofilitásához képest szignifikáns változást megfigyelnünk. Ez a tapasztalat megegyezik egy Gram negatív baktériumban, a *Salmonella typhi-murium*-ban leírtakkal (Stenstrom, 1989).

Sóstresszt követően az eddig tapasztaltakhoz képest kiugróan nagy mértékű sejtfelszíni hidrofilitás-növekedést tapasztaltunk. Mivel ismert tény, hogy a NaCl-stresszt *Bacillus subtilis*-ben elsősorban a DegS/DegU kétkomponensű rendszer érzékeli (Kunst and Rapoport, 1995, Dartois et al., 1998) (melyet sóstressz specifikusnak tartanak), a tapasztalt nagymértékű változás ráirányította figyelmünket erre a rendszerre. NaCl stressz esetén tapasztalataink szerint a vad (168) törzs és a *degU*-deléciós mutáns (QB4487) törzs felszíni hidrofilitása között szignifikáns különbség mutatkozott: a mutáns esetében jóval kisebb mértékben nőtt meg a sejtek felszíni hidrofilitása. Ez az eredmény arra utalt, hogy a DegS/DegU rendszer valamilyen szerepet játszik a sejtfelszíni hidrofilitás-növekedésben, ugyanakkor más szabályozó rendszerek is hozzájárulnak a sejtek felszínének hidrofilebbé válásában, ugyanis a *degU*-mutáns baktériumok esetében is szignifikáns hidrofilitás-növekedés következett be. Az a tény, hogy a DegS/DegU rendszer szerepet játszik a hidrofilitás-növekedésben, lehetőséget nyitott számunkra, hogy a tapasztalt jelenség fiziológiai szerepét tanulmányozhassuk. Az egyik fő kérdés az volt, hogy a DegS/DegU rendszer jelenléte védeltséget nyújt-e az általunk alkalmazott sóstressz ellen. Mint a bevezető részben már említettük, a DegU~P a baktériumok rázatott tenyészetében alkalmazott 1,5 M NaCl stressz esetén növeli a sejtek túlélési esélyét (Ruzal and Sanchez-Rivas, 1994, Ruzal and Sanchez-Rivas, 1998). A mi általunk alkalmazott sóstressz ennél 1,5-szer kisebb volt, és így esetünkben a baktériumok nem kezdtek el pusztulni, viszont felszínük hidrofilebbé vált. Ráztatott tenyészetben, az általunk alkalmazott stressz-körülmények között szignifikáns eltérést a vad és a *degU*-mutáns törzs növekedése között nem tapasztaltunk. Ezzel szemben szilárd táptalajon, ahol a kitapadt sejtek számára az alkalmazott stressz jóval drasztikusabb hatású volt, mint ráztatott tenyészetben, a sejtek nagymértékű pusztulása volt megfigyelhető. Lemezen a *degU*-mutáns sejtek kb. 7-szer jobban tolerálták a stresszt, mint a vad típusúak, ami arra utalt, hogy a kitapadt sejteknél a DegS/DegU kétkomponensű rendszer jelenléte nem elsősorban a túlélést szolgálja sóstressz esetén, hanem valami egyéb funkciója lehet. Ez a funkció ugyanakkor nem kapcsolódik a sejtek felszíni hidrofilitásához, ugyanis lemezen a két törzs hidrofilitása között nem találtunk eltérést.

Mivel a flagellin szintéziséért felelős gének a σ^D regulon tagjai, és ezek expressziója (közvetetten) a DegU foszforiláltságától függ (Rashid et al., 1996, Kunst et al., 1994, Liu and Zuber, 1998), logikus volt feltételezni, hogy a sejtfelszíni hidrofilitásban bekövetkező változások befolyásolják a sejtek motilitását, például a kitapadási tulajdonságok

megváltoztatása révén. Kitapadási kísérletünkben bizonyítottuk, hogy NaCl stressz esetén a *degU* mutáns törzs tagjai jóval nagyobb mértékben (erősebben) tapadtak a szilárd hordozóhoz, mint a vad típusú baktériumok. Ennek alapján megállapítható, hogy a DegS/DegU rendszer által NaCl stressz esetén okozott hidrofilitás növekedés egyik fiziológiai szerepe a stresszelt baktériumok kitapadásának gátlása, miáltal azok motilitása nő. Ez logikus lépés a baktériumok részéről, hiszen amennyiben azok mozgékonyabbak, könnyebben el tudnak „menekülni” a talajban a stresszortól. Megjegyzendő, hogy a 168 törzs esetében a kontroll és a stresszelt baktériumok kitapadási tulajdonságai megegyeztek annak ellenére, hogy a stresszelt esetben a sejtfelszíni hidrofilitás megnőtt. Ennek a látszólagos ellentmondásnak az a magyarázata, hogy a megváltozott ionerősség mellett valószínűleg ez a mértékű hidrofilitás-növekedés volt szükséges a kitapadás elkerüléséhez. A DegU és a DegU~P közül valószínűleg a DegU~P befolyásolta a sejtfelszíni hidrofilitást, mivel valószínűleg ez akkumulálódik NaCl stressz esetén (Kunst and Rapoport, 1995, Dartois et al., 1998). Ennél a pontnál szükséges visszatérnünk arra a hipotézisre, miszerint a NaCl stressz nem inaktiválja a CtsR represszort (Krüger and Hecker, 1998). Mivel a CtsR gátolja a *c/pC* génről induló transzkripciót (Krüger and Hecker, 1998), és a 2. sz. ábra szerint ez lehetővé teszi a ComK σ^D regulonra gyakorolt gátló hatását, ami viszont kizárja a DegU~P akkumulációját NaCl stressz esetén. Mivel bizonyítottan a DegS/DegU rendszer részt vesz a NaCl stressz elleni stresszválaszban, Krüger és Hecker hipotézise ebben a vonatkozásban nem helytálló.

Mint azt korábban említettük, a DegS/DegU rendszeren kívül más rendszer (vagy rendszerek) is valószínűleg hozzájárulnak a sejtfelszíni hidrofilitás NaCl stressz esetén tapasztalt megnövekedéséhez, mivel a *degU* mutáns törzs is szignifikáns mértékű hidrofilitás-növekedést mutatott. A következőkben, az ebben a folyamatban esetlegesen szerepet játszó szabályozó rendszereket próbáltuk beazonosítani. Először megvizsgáltuk, hogy stressz-specifikus válasznak vagy általános stresszválasznak tekintendő-e a stressz esetén tapasztalt hidrofilitás-növekedés.

Ismeretes, hogy a sejtek azonnal stacionáris fázisba lépnek, amint valamely esszenciális tápanyag-komponensben kimerül a médium (Aronis, 1993). Ez a válasz különbözik attól a tápanyag-limitáció okozta specifikus választól (pl. foszfát- vagy C-limitáció), mikor a sejtek folytatják a növekedést, de a szuboptimális növekedés jeleit a sejtek érzékelik (Aronis, 1993). Ennek a jelenségnek a sejtfelszíni hidrofilitásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk részleteiben a foszfát-éhezési, foszfát-limitációs és C-limitációs kísérleteinkben. A foszfát-mentes médiumban a baktériumok stacionáris-fázis specifikus választ mutattak. A foszfát és a C (energia) limitációnál tápanyag-specifikus választ vártunk. Azonban a sejtfelszíni hidrofilitásnak a foszfát-éhségéhez nagyon hasonló megnövekedését lehetett megfigyelni,

ami arra utal, hogy a tapasztalt hidrofilitás-növekedés általános stresszválasznak tekintendő.

Mint korábban már ismertettük, az általános stresszfehérjék génjeinek promotereit a σ^B alternatív szigma-faktor ismeri fel. A σ^B -regulont indukálja az energiaszorongás illetve valószínűleg a GTP-drop, a legtöbb stressz-körülmény között. Ezért két gátlószert próbáltunk választ adni arra a kérdésre, hogy az energiaszorongás és/vagy a GTP-koncentráció csökkenése a sejtfelszíni hidrofilitás megnövekedéséhez vezethet-e.

A mikofenolsav (MPS) a GTP és az ATP intracelluláris koncentrációját csökkenti (Wu and Scrimgeour, 1973). Az MPS hatásmechanizmusát korábban már ismertettük. Méréseink megerősítették, hogy az MPS hatására nagy mértékű ATP és GTP koncentráció-csökkenés következett be. Az ATP-esés mértéke hasonló volt ahhoz, mint amit B. Maul Luciferáz-assay-el mért. Az MPS kezelés hatására szignifikánsan megnőtt a sejtfelszíni hidrofilitás mértéke, mely változás kinetikája hasonló volt az ATP és a GTP koncentrációesés kinetikájához, azt sugallva, hogy az említett folyamatok között összefüggés van.

A 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) nevű szétkapcsolószert hatásmechanizmusát korábban már ismertettük. A 2,4-DNP kezelés hatására a sejtfelszíni hidrofilitás jelentős mértékben megnövekedett, ugyanakkor kismértékű ATP és valamivel nagyobb mértékű GTP koncentráció emelkedést tapasztaltunk, mely eredmények kizárták azt a hipotézisünket, hogy az ATP és/vagy a GTP koncentrációcsökkenés feltétlenül szükséges lenne a sejtfelszíni hidrofilitás megnövekedéséhez. Az a jelenség, hogy a 2,4-DNP kezelés után a sejtek ATP-készlete kismértékben nőtt, ellentétben a σ^B -kísérletekben tapasztalt 2,4-DNP kezelés hatásával, mikor a sejtek ATP-készlete kismértékben csökkent, azzal magyarázható, hogy a két kísérletben eltérő tápoldatot használtunk. A hidrofilitás-kísérletben használt tápoldatban valószínűleg olyan körülmények jöttek létre, hogy a 2,4-DNP erősítette a ΔpH -t. A tápanyag-éhezési és limitációs kísérletek, az MPS és a 2,4-DNP kísérletek eredményei ugyanakkor felhívták a figyelmet arra, hogy esetleg a σ^B regulon szerepet játszhat a sejtfelszíni hidrofilitás-növekedésben, mivel olyan általános stresszválasznak tekintendő a hidrofilitás növekedés, melyet valószínűleg az ATP és/vagy a GTP koncentráció-csökkenés képes indukálni, jelenlétük azonban nem feltétlenül szükséges a válaszhoz. A σ^B regulon ebben a folyamatban játszott esetleges szerepének tisztázására azonban még további kísérletek szükségesek.

5.3 Eredményeink gyakorlati alkalmazása

Az oxigén-limitációs kísérleteink esetében tapasztaltuk, hogy a baktérium anyagcseréjének igényeit nem kielégítő légkör nagyon komoly stresszhatást jelent a baktériumok számára. Ezen az elven alapulnak például az élelmiszeripari csomagolásban használatos védőgáz csomagolási technológiák is, melyek célja az élelmiszert táptalajként felhasználó mikroorganizmusok növekedésének gátlása, ezáltal az élelmiszer romlásának lassítása. Mivel a különböző élelmiszer-fajták (hal, baromfi, többi hús, zöldség-gyümölcs) eltérő természetes baktérium-flórával rendelkeznek, ezért ezeknél különböző összetételű védőgázkeverékeket szükséges alkalmazni. Bár a védőgáz csomagolási technológia nagyüzemi méretekben általánosan elterjedt, nem állt rendelkezésre a háztartásokban. Ennek elsődleges oka a gázkeverékek létrehozásának nagy helyigénye volt, mivel a gázpalackok nagy helyet foglalnak el. A Linde Gáz Magyarország Rt és a Linde AG (Németország) közreműködésével kifejlesztettünk egy olyan készüléket, amely gázpatronokból képes a szükséges gázkeveréket létrehozni anélkül, hogy a tárolóedényben a légkörhöz képest túlnyomás jönne létre. Az általunk kifejlesztett készülék azonban Petri-csészék tárolására is alkalmas, mely esetben pl. a speciális légkört igénylő baktérium-tenyészetek növesztése megoldható. A készülék tervezése során egy speciális adagoló-mechanizmus került kifejlesztésre, mely pontosan a szükséges mennyiségű gázt adagolja a tárolóedénybe. Ugyanezt az adagoló mechanizmust felhasználva létrehoztunk egy olyan készüléket, amellyel mind porított, mind pedig folyékony gyógyszerek inhalálhatóak. Mindkét készüléket bejelentettük a Német Szabadalmi- és Védjegy Hivatalhoz világszabadalmi igénnyel. Mivel a világszabadalom esetében a védelem megadása több évet vesz igénybe, a Bejelentő Linde AG nem járult hozzá a szabadalmak tárgyának bővebb ismertetéséhez.

6 Hivatkozások

Ádám, Gy., Fehér, O., Élettan biológusoknak, Tankönyvkiadó, 1990, kézikönyv.

Ahmed, M., Borsch, C.M., Taylor, S.S., Vázquez-Laslop, N., Neyfakh, A.A. (1994) A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J Biol Chem* 269, 28506-28513.

Akbar, S. and Price, C.W. (1996) Isolation and characterization of *csbB*, a gene controlled by *Bacillus subtilis* general stress transcription factor σ^B . *Gene* 177, 123-128.

Akbar, S., Kang, C.M., Gaidenko, T., Price, C.W. (1997) Modulator protein RsbR regulates environmental signaling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 24, 567-578.

Alper, S., Duncan, L., Losick, R. (1994) An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* 77, 195-205.

Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Hecker, M. (1995) A gene at 333° on the *Bacillus subtilis* chromosome encodes the newly identified σ^B -dependent general stress protein GspA. *J Bacteriol* 177: 3540-3545.

Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Hecker, M. (1996) General and oxidative stress response in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J Bacteriol* 178, 6571-6578.

Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., Lapidus, A., Hecker, M. (1997a) Expression of a stress and starvation-induced *dps/pexB* homologues gene is controlled by the alternative sigma factor σ^B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 179, 7251-7256.

Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Mach, H., Völker, U., Hecker, M. (1997b) First steps from two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 18, 1451-1463.

Appleby, J.L., Parkinson, J.S., Bourret, R.B. (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*. 86, 845-8.

Aronis, R. H. (1993) Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72, 165-168

Aronis, R. H. (1996) Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 887 – 893.

Ayusawa, D., Yoneda, Y., Yamane, K., Maruo, B. (1975) Pleiotropic phenomena in autolytic enzyme(s) content, flagellation, and simultaneous hyperproduction of extracellular amylase and protease in a *Bacillus subtilis* mutant. *J. Bacteriol.* 124, 459-469.

Becker, G., Klauck, E., Hengge-Aronis, R. (2000) The response regulator RssB, a recognition factor for sigmaS proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti-sigmaS factor. *Mol. Microbiol.* 35, 657 – 666.

Benson, A.K. and Haldenwang, W.G. (1992) Characterization of a regulatory network that controls σ^B expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174, 749-757.

Benson, A.K. and Haldenwang, W.G. (1993a) Regulation of σ^B levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175, 2347-2356.

Benson, A.K., Haldenwang, W.G. (1993b) The σ^B dependent promoter of the *Bacillus subtilis* *sigB* operon is induced by heat shock. *J. Bacteriol.* 175, 1929-1935.

Bibikov, S.I., Biran, R. Rudd, K.E., Parkinson, J.S. (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 4075-4079.

Binnie, C., Lampe, M., Losick, R. (1986) Gene encoding the σ^{37} species of RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5943-5947

Von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, M., Bremer, E. (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcriptional factor sigma B. *Mol Microbiol* 25: 175-187.

Bordes, P., Repoila, F., Kolb, A., Gutierrez, C. (2000) Involvement of differential efficiency of transcription by σ^{70} and σ^{32} RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli* *osmE* promoter. Mol. Microbiol. 35, 845 – 853.

Boylan, S.A., Thomas, M.D., Price, C.W. (1991) Genetic method to identify regulons controlled by nonessential elements: isolation of a gene dependent on alternate transcription factor σ^B of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 173, 7856-7866.

Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., Price, C.W. (1993) Stress-induced activation of the σ^B transcription factor of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 175, 7931-7937.

Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. Mol. Microbiol. 9, 671 – 680.

Caramori, T., Barilla, D., Nessi, C., Sacchi, L., Galizzi, A. (1996) Role of FlgM in σ^D -dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178, 3113-3118.

Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan, Y. (1997) Cell-surface hydrophobicity and cell-surface charge of *Azospirillum* spp. FEMS Microbiol. Ecol. 24, 159-172.

Chang, C., Meyerowitz, E.M. (1994) Eukaryotes have "two-component" signal transducers. Res. Microbiol., 145:481-486.

Chung, Y.S., Dubnau, D. (1995) ComC is required for the processing and translocation of ComGC, a pilin-like competence protein of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 15, 543-551.

Chung, Y.S., Dubnau, D. (1998) All seven *comG* open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 180, 41-45.

Csonka, L.N., Epstein, W. (1996) Osmoregulation. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd edn, pp. 1210-1223. Edited by F.C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Dahl, M.K., Msadek, T., Kunst, F., Rapoport, G. (1991) Mutational analysis of the *Bacillus subtilis* DegU regulator and its phosphorylation by the DegS protein kinase. J. Bacteriol., 173, 2539-2547.

Dahl, M.K., Msadek, T., Kunst, F., Rapoport, G. (1992) The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 267, 14509-14514.

Dartois, V., Debarbouille, M., Kunst, F., Rapoport, G. (1998) Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 180, 1855 – 1861.

Derré, I. and Msadek, T. (1997) CtsR is a DNA-binding protein controlling class III heat shock gene expression in *Bacillus subtilis*. abstr. G121. In Abstracts of posters. 9th International Conference on Bacilli.

Van Dien, S.J., Keasling, J.D. (1998) A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. J. Theor. Biol. 190, 37 49.

Dri, A.M., Moreau, P.L. (1994) Control of the LexA regulon by pH: evidence for a reversible inactivation of the LexA repressor during the growth cycle of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 12, 621-629.

D'Souza, C., Nakano, M.M., Zuber, P. (1994) Identification of *comS*, a gene of the *srfA* operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9397-9401

Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev. 55, 395–424.

Dubnau, D. (1993) Genetic exchange and homologous recombination, p. 555-584. In Sonenshein A.L., Hoch, J.A., Losick R. (ed.) *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Dubnau, D., Hahn, J., Roggiani, M., Piazza, R., Weinrauch, Y. (1994) Two-component regulators and genetic competence in *Bacillus subtilis*. Res. Microbiol. 145, 403-411.

Dubnau, D. (1997) Binding and transport of transforming DNA by *Bacillus subtilis*: the role of type-IV pilin-like proteins – a review. Gene 192, 191-198.

Dufour, A. and Haldenwang, W. (1994) Interactions between a *Bacillus subtilis* anti- σ factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). J Bacteriol 176, 1813-1820.

Duncan, M.L., Kalman, S.S., Thomas, S.M., Price, C.W. (1987) Gene encoding the 37.000-Dalton minor sigma factor of *Bacillus subtilis* RNA polymerase: isolation, nucleotide sequence, chromosomal location, and cryptic function. J Bacteriol 169, 771-778.

Engelmann, S., Linder, C., Hecker, M. (1995) Cloning, nucleotide sequence and regulation of *katE* encoding a σ^B -dependent catalase in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 177, 5598-5605.

Fredrick, K., Helmann, J.D. (1996) FlgM is a primary regulator of σ^D activity, and its absence restores motility to a *sinR* mutant. J. Bacteriol, 178, 7010-7013.

Gaidenko, T.A., Price, C.W. (1998) General stress transcription factor σ^B and sporulation transcription factor σ^H each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. J. Bacteriol. 180, 3703-3733.

Gaidenko, T.A., Yang, X., Lee, Y.M., Price, C.W. (1999) Threonine phosphorylation of modulator protein RsbR governs its ability to regulate a serine kinase in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. J Mol Biol 288, 29-39.

Gerth, U., Krüger, E., Derre, I., Msadek, T., Hecker, M. (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the ClpP protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. Mol Microbiol 28, 787-802.

Hahn, J., Dubnau, D. (1991) Growth stage signal transduction and the requirements for *srfA* induction in development of competence. J. Bacteriol. 173, 7275-7282.

Hahn, J., Kong, L. , Dubnau, D. (1994) The regulation of competence transcription factor synthesis constitutes a critical control point in the competence regulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol 176, 5753-5761.

Hahn, J. Roggiani, M., Dubnau, D. (1995) The major role of SpOA in genetic competence is to downregulate *abrB*, an essential competence gene. J. Bacteriol. 177, 3601-3605.

Haijema, B.J., Hamoen, L.W., Kooistra, J., Venema, G., van Sinderen, D. (1995) Expression of the ATP-dependent deoxy-ribonuclease of *Bacillus subtilis* is under competence-mediated control. *Mol. Microbiol* 15, 203-211.

Haijema, B.J., van Sinderen, D., Winterling, Kooistra, J., K., Venema, G., Hamoen, L.W. (1996) Regulated expression of the *dinR* and *recA* genes during competence development and SOS induction in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol* 22, 75-85.

Haldenwang, W.G. and Losick, R. (1980) Novel RNA polymerase σ factor from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7000-7004.

Haldenwang, W.G. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 59, 1-30.

Hamoen, L.W., Eshuis, H., Jongbloed, J., Venema, G., van Sinderen, D. (1995) A small gene, designated *comS*, located within the coding region of the fourth amino acid activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 15, 203-211.

Hamoen, L.W., van Werkhoven, A.F., Bijlsma, J.J.E., Bubnau, D. (1998) The competence transcription factor of *Bacillus subtilis* recognizes short A/T rich sequences arranged in a unique, flexible pattern. *Genes Develop.* 12, 1539-1550.

Harold, F. M. (1986) *In: The vital force: a study of bioenergetics.* W. H. Freeman and company, New York, p. 211.

Hecker, M., Völker, U., Heim, C. (1989) RelA-independent (p)ppGpp accumulation and heat shock protein induction after salt stress in *Bacillus subtilis*. *FEMS Lett* 58, 125-128.

Hecker, M. and Völker, U. (1990) General stress proteins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Ecol* 74, 197-214.

Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19, 417-428.

Hecker, M. and Völker, U. (1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of the growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the σ^B regulon. *Mol Microbiol* 29, 1129-1136.

Henner, D.J., Yang, M, Ferrari, E. (1988) Localization of *Bacillus subtilis* *sacU*(Hy) mutations to two linked genes with similarities to the conserved procaryotic family of two-component signalling systems. J. Bacteriol 170, 5102-5109.

Hill, S., Austin, S. Eydmann, T., Jones, T., Dixon, R. (1996) *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcription activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2143-2148.

Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K., Yamane, K. (2000) Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. Microbiology 146, 65 – 75.

Hoch, J.A. (1993) Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annu. Rev. Microbiol. 47, 441-65.

Hoch, J.A., Silhavy, T..J. (Eds.) (1995) Two-component Signal Transduction. : ASM Press

Huang, X.A., Decatur, A., Sorokin, A., Helmann, J.D. (1997) The *Bacillus subtilis* σ^X protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to the survival of high-temperature stress. J Bacteriol 179, 2915-2921.

Huang, X., Fredrick, K.L., Helmann, J.D. (1998) Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : Autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. J Bacteriol 180, 3765-3770.

Hulett, F.M. (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 19, 933-939.

Igo, M., Lampe, M., Ray, C., Schafer, W., Moran, C.P., Losick, R. (1987) Genetic studies of a secondary RNA polymerase sigma factor in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 169, 3464-3469.

Jiang, M., Grau, R., Perego, M. (2000) Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 182, 303-310.

Kalman, S, Duncan, M.L., Thomas, S.M., Price, C.W. (1990) Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. J Bacteriol 172, 5575-5585.

Kang, C.M., Brody, M.S., Akbar, S., Yang, X., Price, C.W. (1996) Homologues pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B in response to environmental stress. *J Bacteriol* 178, 3846-3853.

Kang, C.M., Vijay, K., Price, C.W. (1998) Serine kinase activity of a *Bacillus subtilis* switch protein is required to transduce environmental stress signals but not to activate its target PP2C phosphatase. *Mol Microbiol* 30, 189-196.

Kashket, E.R. (1982) Stoichiometry of the H⁺-ATPase of growing and resting, aerobic *Escherichia coli*. *Biochemistry* 21, 5534-5538.

Kong, L., Dubnau, D. (1994) Regulation of competence-specific gene expression by Mec-mediated protein-protein interaction in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5793-5797.

Kovacs, T., Hargitai, A., Kovacs, K.L., Mecs, I. (1998) pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor σ^B in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 323 – 328.

von Kruger, W. M., Humphreys, S., Ketleym J.M. (1999) A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* 145, 2463 – 2475.

Krüger, E., Völker, U., Hecker, M. (1994) Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* 176, 3360-3367.

Krüger, E., Msadek, T., Hecker, M. (1996) Alternate promoters direct stress induced transcription of the *Bacillus subtilis clpC* operon. *Mol Microbiol* 20, 713-723.

Krüger, E. and Hecker, M. (1997) *Bacillus subtilis clpC*, pp. 243-245. In M.J. Gething (ed.). *Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Krüger, E., Msadek, T., Ohlmeier, S., Hecker, M. (1997) The *Bacillus subtilis clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology* 143, 1309-1316.

Krüger, E. and Hecker, M. (1998) The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. J Bacteriol 180, 6681-6688.

Kunst, F., Msadek, T., Rapoport, G. (1994), p. 1-20. In P.J. Piggot, C.P. Moran and P. Youngman (ed), Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Kunst, F., Rapoport, G. (1995) Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 177, 2403 – 2407.

Kunst, F., et al. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390, 249-256.

Kuroda, A., Sekiguchi, J. (1993) High-level transcription of the major *Bacillus subtilis* autolysin operon depends on expression of the sigmaD gene and is affected by a *sin* (*flaD*) mutation. J. Bacteriol. 175, 795-801.

Lazarevic, V., Margot, P., Soldo, B., Karamata, D. (1992) Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* *lytRABC* divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. J Gen Microbiol 138, 1949-1961.

Lazazzera, B.A., Grossman, A.D. (1998) The ins and outs of peptide signaling. Trends Microbiol. 6, 288-294.

Lazazzera, B.A., Kurtser, I.G., McQuade, R.S., Grossman, A.D. (1999) An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181, 5193-5200.

Leyer, G.G., Johnson, E.A. (1993) Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. Appl. and Env. Microbiol. 59, 1842-1847.

Liu, J., Zuber, P. (1998) A molecular switch controlling competence and motility: competence regulatory factors ComS, MecA, and ComK control σ^D -dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 180, 4243-4251.

Ma, S., Selvaraj, U., Ohman, D.E., Quarless, R., Hassett, D.J., Wozniak, D.J. (1998) Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 180, 956-68.

Maghunson, R., Solomon, J., Grossman, A.D. (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence feromone from *B. subtilis*. Cell 77, 207-216

Márquez, L.M., Helmann, J.D., Ferrari, E., Parker, H.M., Ordal, G.W., Chamberlin, M.J. (1990) Studies of σ^D -dependent functions in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 172, 3435-3443.

Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S., Hecker, M. (1995) σ^B -dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet 248, 114-120.

Mirel, D.B., Lauer, P., Chamberlin, M.J. (1994) Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a σ^D -dependent operon of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176, 4492-4500.

Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, X., Schumann, W. (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. EMBO J 15, 4579-4590.

Mogk, A., Völker, A., Engelmann, S., Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1998) Non-native proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. J Bacteriol 180, 2895-2900.

Mohan, S., Dubnau, D. (1990) Transcriptional regulation of *comC*: evidence for a competence-specific transcription factor in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 172, 4064-4071.

Moran, C.P., Lang, J.N., Losick, R. (1981) Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* promoter recognized by *Bacillus subtilis* RNA polymerase containing σ^{37} . Nucleic Acids Res 9, 5979-5990.

Msadek, T., Kunst, F., Henner, D., Klier, A., Rapoport, G., Dedoner, R. (1990) Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus*

subtilis: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. J. Bacteriol. 172, 824-83.

Msadek, T., Kunst, F., Rapoport, G. (1993) Two-component regulatory systems. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (eds) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 729-745.

Msadek, T., Kunst, F., Rapoport, G. (1994) *MecB* of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and survival at high temperature. Proc Natl Acad Sci USA 91, 5788-5792.

Msadek, T. (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol. 7, 201-207.

Mueller, J.P., Bukusoglu, G., Sonenshein, A.L. (1992) Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes – control of *gsiA* by the ComP-ComA signal transduction system. J Bacteriol 174: 4361-4373.

Mukai, K., Kawata, M., Tanaka, T. (1990) Isolation and phosphorylation of the *Bacillus subtilis degS* and *degU* gene products. J. Biol. Chem. 265, 20000-20006.

Mukai, K., Kawata-Mukai, M., Tanaka, T. (1992) Stabilization of phosphorylated *Bacillus subtilis* DegU by DegR. J. Bacteriol 174, 7954-7962.

Nagami, Y., Tanaka, T. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of a DNA fragment from *Bacillus natto* that enhances production of extracellular protease and levansucrase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 166, 20-28.

Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O., Berche, P. (2000) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 35, 800 – 811.

Nakano, M.M., Zuber, P. (1989) Cloning and characterization of *srfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 171, 5374-53553.



Nakano, M.M., Zuber, P. (1993) Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 175, 3188-3191.

Nakano, M.M., Zuber, P. (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). Annu. Rev. Microbiol. 52, 165-190.

Nanamiya, H., Ohashi, Y., Asai, K., Moriya, S., Ogasawara, N., Fujita, M., Sadia, Y., Kawamura, F. (1998) ClpC regulates the fate of a sporulation initiation sigma factor, σ^H protein, in *Bacillus subtilis* at elevated temperatures. Mol Microbiol 29, 505-513.

Nixon, B.T., Ronson, C.W., Ausubel, F.M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7850 – 7854.

Nygaard, P., Duckert, P., Saxild, H.H. (1997) Role of adenine deaminase in purine salvage and nitrogen metabolism and characterization of the *ade* gene in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178, 846-853.

Ogura, M., Kawata-Mukai, M., Itaya, M., Takio, K., Tanaka, T. (1994) Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176, 5673-5680.

Ogura, M., Tanaka, T. (1996) Transcription of *Bacillus subtilis* *degR* is σ^D -dependent and suppressed by multicopy *proB* through σ^D . J. Bacteriol. 178, 216-222.

Ogura, M., Tanaka, T. (1997) *Bacillus subtilis* ComK negatively regulates *degR* gene expression. Mol. Gen. Genet. 254, 157-165.

Ogura, M., Liu, L., Lacelle, M., Nakano, M.M., Zuber, P. (1999) Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 32, 799 – 812.

Perego, M. (1998) Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. Trends Microbiol. 6, 366-370.

Petersohn, A., Antelmann, H., Gerth, U., Hecker, M. (1999) Identification and transcriptional analysis of new members of the σ^B regulon in *Bacillus subtilis*. Microbiology 145, 869-880.

Piazza, F., Tortosa, P., Dubnau, D. (1999) Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. J. Bacteriol. 181, 4540 – 4548.

Ptashne, M., Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. Nature 386, 569-577.

Rashid, M. H., Tamakoshi, A., Sekiguchi, J. (1996) Effects of *mecA* and *mecB* (*clpC*) mutations on expression of *sigD*, which encodes an alternative sigma factor, and autolysin operons and on flagellin synthesis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol 178, 4861-4869.

Richter, A. and Hecker, M. (1986) Heat shock proteins in *Bacillus subtilis*. A two-dimensional electrophoresis study. FEMS Microbiol Lett 36, 69-71.

Riethdorf, S., Völker, U., Gerth, U., Winkler, A., Engelmann, S., Hecker, M. (1994) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* *lon* gene. J Bacteriol 176, 6518-6527.

Roggiani, M., Hahn, J., Dubnau, D. (1990) Supression of early competence mutations in *Bacillus subtilis* by *mec* mutations. J. Bacteriol., 172, 4056-4063.

Roggiani, M., Dubnau, D. (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. J. Bacteriol. 175, 3182-3187.

Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 9, 29-33.

Ruzal, S.M., Sanchez-Rivas, C. (1994) Physiological and genetic characterization of the osmotic stress response in *Bacillus subtilis*. Can. J. Microbiol. 40, 140 – 144.

Ruzal, S.M., Sanchez-Rivas, C. (1998) In *Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. Can. J. Microbiol. 40, 140 – 144.

Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Völker, U., Hecker, M. (1998) Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 180, 1869-1877.

Schmidt, A., Schiesswohl, M., Völker, U., Hecker, M., Schumann, W. (1992) Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 174, 3993-3999.

Schulz, A. and Schumann, W. (1996) *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis dnaK* operon, encodes a negative regulator of class I. heat shock genes. J Bacteriol 178, 1088-1093.

Sekiguchi, J., Takada, N., Okada, H. (1975) Genes affecting the productivity of α -amylase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 121, 688-694.

Serron, P., Sonenshein, A.L. (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. J. Bacteriol 178, 5910-5915.

van Sinderen, D. Venema, G. (1994) *comK* acts as an autoregulator control switch in the signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176: 5762-5770.

van Sideren, D., Luttinger, A., Kong, L., Dubnau, D., Venema, G., Hamoen, L. (1995) *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 15, 455-462.

Solomon, J.M., Magnuson, R., Srivastava, A., Grossman, A.D. (1995) Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. Genes Dev. 9: 547-558.

Söderback, E., Reyes-Ramirez, F., Eydmann, T., Austin, S., Hill, S., Dixon, R. (1998) The redox- and fixed nitrogen-responsive regulatory protein NifL from *Azotobacter vinelandii* comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. Mol. Microbiol. 28, 179-192.

Spiegelman, G.B., Bird, T.H., Voon, V. (1995) In: Hoch J.A. and Silhavy T.J. (Eds.) *Two-component Signal Transduction*. (pp. 159-179) : ASM Press

Stenstrom, T.A. (1989) Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. Appl Environ Microbiol 55(1), 142-147.

Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M.F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S.D., Hulett, F.M. (1996a) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178, 1374-1385.

Sun, G., Birkey, S.M., Hulett, F.M. (1996b) Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 19, 941-948.

Szabó, I. (1994) A bioszféra mikrobiológiája. Akadémiai kiadó. 207. oldal.

Tanaka, T., Kawata, M., Mukai, K. (1991) Altered phosphorylation of *Bacillus subtilis* DegU caused by single amino acid changes in DegS. J. Bacteriol. 173, 5507-5515.

Tanaka, T., Kawata, M., Mukai, M. (1994) Stabilization of phosphorylated form of *Bacillus subtilis* DegU caused by *degU9* mutation. FEMS Microbiol. Lett. 115, 93-96.

Tanaka, T., Kawata, M. (1988) Cloning and characterization of *Bacillus subtilis iep*, which has positive and negative effects on production of extracellular proteases. J. Bacteriol. 170, 3593-3600.

Taylor, B.L., Zhulin, I. B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 479 – 506.

Tokunaga, T., Rashid, M. H., Kuroda, A., Sekiguchi, J. (1994) Effect of *degS-degU* mutations on the expression of *sigD*, encoding an alternative sigma factor, and autolysin operon of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176, 5177-5180.

Tortosa, P., Albano, M., Dubnau, D. (2000) Characterization of *ylbF*, a new gene involved in competence development and sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 35, 1110 – 1119.

Truitt, C.L., Weaver, E.A., Haldenwang, W. (1988) effects of growth and sporulation on inactivation of a *Bacillus subtilis* gene (*ctc*) transcribed *in vitro* by minor vegetative cell RNA polymerases ($E-\sigma^{37}$, $E-\sigma^{32}$). Mol Gen Genet 212, 166-171.

Turgay, K., Hamoen, L., Venema, G., Dubnau, D. (1997) Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. Genes Dev 11, 119-128.

Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., Dubnau, D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. EMBO J. 17, 6730-6738.

Varón, D., Boylan, S.A., Okamoto, K., Price, C.W. (1993) *Bacillus subtilis gtaB* encodes UDP-glucose pyrophosphorilase and is controlled by stationary-phase transcription factor σ^B . J Bacteriol 175, 3964-3971.

Varón, D., Brody, S., Price, C.W. (1996) *Bacillus subtilis* operon under the dual control of the general stress transcription factor σ^B and the sporulation transcription factor σ^H . Mol Microbiol 20: 339-350.

Vijay, K., Brody, M.S., Fredlund, E., Price, C.W. (2000) A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 35, 180 – 188.

Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1995). Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. J Bacteriol 177, 3771-3780.

Voelker, U., Voelker, A., Haldenwang, W.G. (1996) The yeast two-hybrid system detects interactions between *Bacillus subtilis* σ^B regulators. J. Bacteriol. 178, 7020 – 7023.

Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M. (1994) Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. Microbiology 140, 741-752.

Völker, U., Dufour, A., Haldenwang, W.G. (1995) The *Bacillus subtilis rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of σ^B . J Bacteriol 177, 114-122.

Völker, U., Andersen, K.K., Antelmann, H., Devine, K.M., Hecker, M. (1998) One of two OsmC homologs in *Bacillus subtilis* is part of the σ^B -dependent general stress regulon. J Bacteriol 180, 4212-4218.

Weinrauch, Y., Penchev, R., Dubnau, E., Smith, I., Dubnau, D. (1990) A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein

members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev.* 4, 860-872

Wetzstein, M., Völker, U., Dedio, J., Löbau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Herget, C., Hecker, M., Schumann, W. (1992) Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174, 3300-3310.

Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J. (1998) General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 180, 3650-3656.

Wise, A.A., Price, C.W. (1995) Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor σ^B in response to environmental signals. *J. Bacteriol.* 177, 123-133.

Wu, T. W. and Scrimgeour (1973) Properties of inosinic acid dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. II. Kinetic properties. *Can J Biochem* 51, 1391-1398

Yang, X., Kang, C.M., Brody, M.S., Price, C.W. (1996) Opposing pairs of serine proteine kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* 10, 2265-2275.

Yuan, G. and Wong, S.L. (1995) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J. Bacteriol.* 177, 6462-6468.

Zuber, U. and Schumann, W. (1994) CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of the heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 1359-1363.

7 Rövidítések

Rövidítés	Rövidítés jelentése
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AMP	adenozin-5'-monofoszfát

ATP	adenozin-5'-trifoszfát
B. subtilis	Bacillus subtilis
CCCP	karbonil cianid m-klórfenilhidrazon
CSF	kompetencia és sporulációs faktor
CSPD	Fluorescens szubsztrát: dinátrium 3-(4-metoxipiro1,2-dioxetán-3,2'-(5'-klór) triciklo [3.3.1.1(3,7)]dekán-4) fenil foszfát
DCCD	N, N'-diciklohexilkarbodiimid
DEPC	dietil-pirokarbonát
2,4-DNP	2,4-dinitrofenol
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
GDP	guanozin-5'-difoszfát
GMP	guanozin-5'-monofoszfát
GTP	guanozin-5'-trifoszfát
IMP	inozin-5'-monofoszfát
Hidr.	hidrofilicitás
HLP	hisztonszerű-fehérje (Histon Like Protein)
HPLC	magasfelbontású folyadékkromatográfia
Hsp	hő sokk fehérje
lim.	limitáció
min.	perc
MM	minimál tápoldat
MOPS	3-(N-morfolino)propán-szulfonsav
MPS	mikofenolsav
mRNS	hírvivő RNS
n.a.	nincs adat
OD _λ	optikai denzitás, λ hullámhosszon mérve
ON	egy éjszakán át (over night)
PCI	fenol:kloroform:izoamilalkohol – 25:24:1
PMF	proton motoros erő (proton motive force)
PP2C	2-es típusú fehérje-foszfatáz
Rsb	a σ ^B szabályozója (regulator of sigmaB)
rel.	relatív
RNS	ribonukleinsav

S	Svedberg-egység
SDS	Na-dodecil-szulfát
spp.	fajok
ssDNS	egyszálú DNS
TCA	triklór-ecetsav
Tris	Tris-hidroximetil-aminometán
tRNS	szállító RNS
UDP	uridin-5'-monofoszfát

Summary

We focused on the following two major components of general stress response of *Bacillus subtilis* during our work: on the alternative transcriptional factor σ^B as well as on the changes of cell surface hydrophilic-hydrophobic properties during various kinds of stresses.

Experiments concerning the σ^B regulon

17 sigma-factors with different structures has been found in *B. subtilis* until now. σ^B has been the first discovered alternative sigma-factor in *B. subtilis*. Concerning σ^B , it was known that it recognises promoters of general stress protein genes in *B. subtilis*. However, no global function could be connected to σ^B , which would be able to explain the high number of genes (more than 100 genes) belonging to this regulon, respectively, which would be clarify the fact that members of the σ^B regulon are highly inducible during various kinds of stresses (NaCl, glucose-limitation, heat shock, oxygen-limitation, etc.). (It has been shown that the σ^B mutant cells are more sensitive against cumain-hydroperoxide than the wild type did, respectively, lack of *ctc* –which is member of the σ^B regulon- caused loss of ability to sporulate at 48 °C).

8 proteins are known to be involved in the regulation of activity of σ^B . Both PP2C phosphatases (RsbP, RsbU, RsbX) and protein kinases (RsbW, RsbT) could be found among them. It has been proved that energy stress causes activation of the σ^B regulon, however, elements of the signal transduction pathway leading to the activation of σ^B regulon are not characterised until now, moreover, also the direct intracellular signal whose presence is always necessary to the σ^B dependent induction is unidentified.

Concerning σ^B regulon, aims of our work were to serve answer to the following two questions:

What is the direct intracellular signal, whose presence is a basic requirement for induction of σ^B dependent genes? This signal influences most probably the downstream module of the regulation circle controlling the activity of σ^B .

Our other aim was to investigate, whether there is any stress-condition exists against which σ^B provides any protection effect, i.e., to determine the intracellular role of σ^B . We hoped that if we find the direct intracellular signal we could elucidate also this second question.

We tried to identify the direct signal by using various poisons blocking different molecular processes in bacteria. Induction properties of two genes, *sigB* and *gsiB*, belonging to the σ^B regulon, were monitored during treatments with poisons.

According to our results, we could excluded the possibility that an ATP-drop would be the direct intracellular signal, because stress-circumstances under which no ATP-drop occurred, were also able to induce the σ^B regulon, respectively, in case of impact of other stresses, the kinetics of ATP-drop and σ^B -dependent induction differed from each other in a significant manner, at least in several cases. The direct signal role of a GTP-drop is also unlikely, because the impact of the 2,4-DNP (an entcoupler) on the growth of bacteria could be neutralised by guanosine, however, guanosine did not influence the induction properties of the *sigB* gene during 2,4-DNP treatment. However, it was conspicuous that *B. subtilis* reacted upon a relatively mild acid shock by a strong σ^B -dependent induction.

We have proved that changes in the intracellular pH is a basic requirement for the σ^B -dependent induction. Based on our information regarding the direct intracellular signal, we were able to observe a mild protection effect of σ^B against a weak acid shock, during the early stationary phase. This was the first global function, which could be attached definitely to the σ^B regulon. As we published our results, two other publications were printed at the same time (independent from each other as well as from us) with conclusions very similar to those ones that were proven by us. Concerning the regulation of activity of σ^B , we created a hypothesis, in which RsbP would be the central pH sensing molecule.

Experiments regarding the cell surface level response

It has been proven in *Salmonella typhi-murium* and in *Azospirillum spp.* that various kind of stresses could influence the cell surface hydrophilicity properties of bacteria, however, no data were available for similar changes in *Bacillus subtilis*. Our aims, regarding the cell surface level response of *B. subtilis*, were to investigate the following subjects:

We tried to observe any changes in the cell surface properties of *B. subtilis* during several kinds of stresses. If we are able to detect any cell surface level response, it should be

analysed which regulatory components may have a role in changes of the hydrophilicity of cells. We hoped to get information from kinetics and quantity of changes in hydrophilicity, concerning this last question. Moreover, we intended to find out the physiological role of the changes in hydrophilicity.

We have proven that a cell surface level response exists also in *B. subtilis*, according to our results. An especial high level surface hydrophilicity increase could be detected in case of salt stress, which made likely that the DegS/DegU two-component system also has a role in the cell surface level response, because it is known that expression of those genes, which are regulated by this two-component system, changes as a response upon salt stress. Our experiments with the *degU* deletion mutant strain supported the role of this two-component system, however, most probably also other regulation mechanisms influence the cell surface level response.

Results of the phosphate starvation (when the medium did not contain any phosphate) and phosphate- and C-limitation (when the medium contained a suboptimal concentration of phosphate and glucose, respectively) experiments suggested that a general stress response was observed as an increase in hydrophilicity, which made likely a role of the σ^B also in this process.

Based on results of our poison-applying experiments we have proven, that a decrease in intracellular ATP and/or GTP concentration is able to induce the cell surface level response, however, those processes are not basic requirements for this response. We hypothesise that changes in intracellular pH may play a crucial role also in the induction of cell surface level response.

Concerning the physiological role of the cell surface level response, we have proven that this do not decrease the sensitivity of bacteria against stresses, however, it hinders their attachment to soil particles, i.e. it enhances their motility, which is a logical step because of the increased possibility being escaped from the stress conditions. We have proven that this effect is transmitted by the DegS/DegU two-component system. It was known that the DegS/DegU two-component system enhances the motility of bacteria, because the presence of this two-component system is necessary for establishment of motility (it is needed for biosynthesis and assembling of flagellin). Our results indicated that DegS/DegU has an additional role in enhancing the motility of bacteria: it helps maintain the motility (it hinders the attachment of cells to soil particles). It should be noted, that DegS/DegU did not influence



the cell surface properties of that cells which had attached already to the surface of a solid medium, under salt stress conditions.

Practical application of our results

Using our experiences originated from oxygen-limitation experiments, we created a device, which is suitable for package of food in a protective gas atmosphere. This instrument takes into consideration the requirements of foods for differently composed gas-atmosphere, because of their different natural bacterial flora. This device is planned to be used in households. Also bacteria, which requires especially composed atmosphere, could be incubated in this device. The instrument possesses a precise gas-filling part, which was used for creating a new device (as a further development of the elder one) that is suitable for inhalation precisely dosed dosages of both fluid and powder medicaments.

Összefoglalás

Munkánk során a *Bacillus subtilis* általános stresszválaszának két összetevőjére, az alternatív transzkripcionális faktor σ^B -re illetve a sejtfelszíni hidrofil-hidrofób tulajdonságok stressz alatti alakulására összpontosítottunk.

A σ^B regulonra vonatkozó kísérletek

B. subtilis-ben eddig 17 különböző szerkezetű σ faktort írtak le, melyek közül a legrégebben megismert alternatív szigma-faktor a σ^B volt. A σ^B -ről ismert volt, hogy a *B. subtilis* általános stresszgénjeinek promotereit ismeri fel. Ennek ellenére a szigma-faktorhoz nem tudtak olyan globális, stressz-elleni védő funkciót hozzárendelni, amely magyarázta volna a σ^B regulonba tartozó gének nagy számát (ez idáig kb. 100 génről ismert, hogy a regulon tagja), illetve amely magyarázattal szolgált volna azokra az eredményekre, melyek szerint a σ^B regulon nagyon sokféle stressz esetén (NaCl, glükóz-limitáció, hősokk, oxigén-limitáció, stb.) indukálódik. (Bizonyították, hogy a σ^B mutáns sejtek érzékenyebbek kumain-hidroperxidra, illetve 48 °C-on a σ^B regulonba tartozó *ctc* gén hiánya esetén a sporuláció gátolt).

Ez idáig 8 olyan fehérjét ismerünk, melyek részt vesznek a σ^B aktivitásának szabályozásában. Megtalálhatóak köztük a PP2C foszfatazok (RsbP, RsbU, RsbX), illetve a protein-kinázok (RsbW, RsbT) is. Ismert, hogy az energia-stressz a σ^B regulon aktiválásához vezet, azonban nem ismertek a sejten belüli jelátviteli mechanizmus egyes elemei, illetve az a közvetlen sejten belüli molekuláris jel, amely megléte mindenképpen előfeltétele a σ^B regulon aktiválásának (közvetlen jel).

Munkánk σ^B regulonnal kapcsolatos célkitűzései a következők voltak:

Választ próbáltunk találni arra a kérdésre, hogy mi az a sejten belüli jel, ami mindenképpen előfeltétele a σ^B regulon aktiválásának. Ezt a jelet közvetlen jelnek nevezzük, mivel valószínűleg a σ^B aktivitását szabályozó mechanizmusban a σ^B közvetlen környezetében hat (mindenképpen az ún. downstream modul működését befolyásolja).

Továbbá célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy van-e olyan stressz-körülmény, amely esetében a σ^B regulon növeli a baktériumok életképességét (azaz meghatározzuk, hogy mi a

σ^B szerepe). Feltételezhető volt, hogy amennyiben sikerül megismernünk a közvetlen jel természetét, választ találhatunk erre a kérdésre is.

A közvetlen jel természetét különböző hatásmechanizmusú sejtmérgek alkalmazásával kívántuk megfejteni. A mérgekkel való kezelések során nyomon követtük két σ^B regulonba tartozó gén, a *sigB* és a *gsiB* expressziójának alakulását.

Vizsgálataink alapján kizárhattuk a sejt ATP-készletének csökkenésének közvetlen jel szerepét, mivel olyan körülmények között, ahol nem volt ATP-drop, tapasztalható volt indukció, illetve az ATP-drop és a σ^B -függő expresszió kinetikája egyes esetekben jelentősen eltért egymástól. A GTP-koncentrációesés közvetlen jel szerepe szintén valószínűtlen, mivel a 2,4-DNP (szétkapcsoló szer) sejtek növekedésére gyakorolt hatása ellensúlyozható volt guanozinnal, azonban a *sigB* gén 2,4-DNP kezelés hatására bekövetkezett indukcióját a guanozin nem befolyásolta. Feltűnő volt azonban, hogy igen enyhe sav-stressz hatására nagyon heves σ^B -függő indukcióval válaszolt a baktérium.

Bizonyítottuk, hogy a sejten belüli pH-változás előfeltétele a σ^B -függő indukciónak. A közvetlen jel ismeretében megfigyeltük, hogy a σ^B regulon jelenléte védeltséget nyújt enyhe sav-stressz ellen a korai stacionáris fázisban. Ez volt az első globális funkció, melyet a σ^B regulonhoz lehetett rendelni. Eredményeink publikálásával egy időben jelentek meg két (tőlünk és egymástól is) független kutatócsoport hasonló jellegű tapasztalatai. A σ^B szabályozásával kapcsolatban egy modellt állítottunk össze, melyben a pH-változás közvetítésében a központi szerep az RsbP-é.

A sejtfelszíni stresszválással kapcsolatos munkák

Bár *Salmonella typhi-murium*-ban és *Azospirillum* spp.-ben igazolták, hogy különböző jellegű stresszhatások befolyásolják a baktériumok felszíni hidrofilitási tulajdonságait, hasonló kísérleteket *Bacillus subtilis*-ben még nem végeztek. A sejtfelszíni stresszválással kapcsolatban célkitűzéseink a következők voltak:

Választ próbáltunk találni arra a kérdésre, hogy miképp változik a *Bacillus subtilis* sejtfelszíni hidrofilitása stresszhatások esetén. Amennyiben sikerül megfigyelni sejtfelszíni szintű stresszválaszt megvizsgálandó, hogy milyen főbb szabályozó mechanizmusok játszhatnak szerepet a hidrofilitás-változás kiváltásában. Erre nézve a különböző stressz fajták esetén megfigyelt hidrofilitás-változások mértékéből és kinetikájából reméltünk információt kapni.

Továbbá meg kívántuk vizsgálni, hogy mi a sejtfelszíni hidrofilitás-változások élettani szerepe.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy *B. subtilis*-ben is létezik a sejtfelszíni szintű stresszválasz. Különösen nagymértékben hidrofíllé vált a sejtek felszíne sóstressz esetén, ami valószínűsítette a DegS/DegU kétkomponensű szabályozó rendszer részvételét a sejtfelszíni szintű stresszválaszban, ugyanis erről a rendszerről ismert, hogy az általa szabályozott gének expressziója megváltozik sóstressz hatására. A *degU* deléciós mutáns törzzsel végzett kísérleteink arra utaltak, hogy ez a kétkomponensű rendszer valóban részt vesz a sóstressz esetén tapasztalt nagymértékű hidrofilitás-növekedésben, azonban egyéb további szabályozó mechanizmusok részvétele is valószínűsíthető.

Foszfát-éheztetési (a tápoldat egyáltalán nem tartalmazott foszfátot) és foszfát- és C-limitációs (a tápoldat az optimális koncentráció alatti mennyiségben tartalmazott P- és C-forrást) kísérleteink eredményei arra utaltak, hogy a megfigyelt sejtfelszíni hidrofilitás-növekedés általános (tehát nem stressz-specifikus) stresszválasz volt, ami valószínűsíti a σ^B regulon részvételét a megfigyelt sejtfelszíni szintű változásokban.

Gátlószer-kísérleteink eredményei arra utaltak, hogy bár az ATP és/vagy a GTP sejtbeli koncentrációjának csökkenése képes indukálni a sejtfelszíni szintű stresszválaszt, azonban az ATP- és/vagy GTP-drop jelenléte nélkül is bekövetkezik a hidrofilitás növekedése. Elképzelhető, hogy ebben az esetben is szerepet játszik az intracelluláris pH-változás.

A sejtfelszíni szintű stresszválasz fiziológiai szerepével kapcsolatban igazoltuk, hogy az nem csökkenti a sejtek érzékenységét a stresszhatásokkal szemben, azonban meggátolja a sejtek talajrészecskékhez való kitapadását, ami a sejtek motilitását növeli. Ez a stresszválasz logikus, hiszen a baktérium nagyobb eséllyel képes eltávolodni a stressz forrásától. Bizonyítottuk, hogy ezt a hatást a DegS/DegU rendszer közvetíti. Eredményeinkkel kiegészült a DegS/DegU kétkomponensű rendszernek a *B. subtilis* motilitásában játszott szerepéről a kép: azon túlmenően, hogy ez a szabályozó rendszer szükséges a motilitás létrehozásához (a flagellin bioszintéziséhez és összeszerelődéséhez), szerepet játszik annak fenntartásában is (megakadályozza a baktériumok kitapadását). A DegS/DegU rendszer nem befolyásolta a már kitapadt sejtek felszíni hidrofilitását só stressz alatt.

Eredményeink gyakorlati alkalmazása

Az oxigén-limitációs kísérletekben szerzett tapasztalatainkat felhasználva, létrehoztunk egy olyan készüléket, mely alkalmas a háztartásokban a tartósításhoz különböző légkört igénylő (eltérő természetes baktérium-flórával rendelkező) élelmiszerek védőgáz csomagolására. Ugyanebben a készülékben különleges légkört igénylő mikroorganizmusok is növeszthetők Petri-csészén. Ez a készülék rendelkezik egy pontos gáz-adagoló mechanizmussal, melyet felhasználva (az előző készülék továbbfejlesztéseképpen) létrehoztunk egy olyan gyógyszer inhalációs készüléket, amely képes mind porított mind pedig folyékony gyógyszer-készítmények pontosan adagolt mennyiségeit belélegeztetni.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton fejezem ki köszönetem két témavezetőmnek, **Prof. Dr. Kovács Kornélnak** és **Dr. Mécs Imrének** a gondos, munkámat nagymértékben segítő témavezetésért. Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Nemcsók Jánosnak**, hogy helyet biztosított a Környezeti biokémia és biotechnológia Ph.D. programban, illetve **Dr. Ábrahám Tamásné Dr. Gulyás Magdolna** helyettes programvezetőnek hasznos tanácsaiért. Köszönöm **Dr. Kálmán Miklósnak**, hogy helyet biztosított az általa vezetett intézetben.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Michael Heckernek**, hogy helyet és biztosított intézetében a σ^B -vel kapcsolatos munkák elvégzéséhez, illetve az ML6-törzs rendelkezésemre bocsátásáért. Köszönetem fejezem ki **Dr. Susanne Engelmann** és **Dr. Uwe Völker** részére az mRNS-specifikus digoxigenin-jelölt RNS-próbákért. Köszönöm **Dr. Veronique Dartois** és **Prof. Dr. Georges Rapoport** segítségét, hogy megküldték a QB4487 törzset. Köszönöm **Dr. Björn Maulnak** Luciferáz-assay adatainak rendelkezésemre bocsátását. Köszönettel tartozom **Dr. Sabine Riethdornak** a puromicin-kezelés során izolált mRNS minták rendelkezésemre bocsátásáért. Köszönöm **Dr. Shamila Nairnak** hasznos tanácsait a hidrofilitás-kísérletekkel kapcsolatban.

Köszönöm **Dr. Ládi Zsoltnak** és **Moórung Mónikának** a szabadalmak kidolgozásában való közreműködést.

Köszönöm **Hargitai Attilának** (hidrofilitás- és σ^B munkák) és **Bihari Zoltánnak** (HPLC-munkák) a közreműködést.

Köszönöm **Kovács Árpádnének** és **Übelhardt Anitának** az értekezés kéziratának nyelvtani-nyelvhelyességi szempontú áttanulmányozását.

